

Einfluss der microRNA-322 bzw. microRNA-497 auf den
– in der Lungenentwicklung bedeutenden –
Signalweg von „*retinoic acid*“ bzw.
„*transforming growth factor-β*“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Junker, Lena Alysha
aus Saarbrücken

Saarbrücken 2019

Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim,
unter der Leitung von Prof. Dr. Werner Seeger,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Seeger
2. Gutachter: Prof. Dr. Tilman Borggrefe

Tag der Disputation: 14.10.2019

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Die menschliche Lunge und ihre Entwicklung	1
1.2 Unterschiede zur Maus	3
1.3 Bronchopulmonale Dysplasie	4
1.4 Vitamin A und Retinoide	7
1.4.1 Metabolismus	8
1.4.2 Rezeptoren	8
1.4.3 Beeinflussung der Lungenentwicklung	10
1.5 Transformierender Wachstumsfaktor - β	11
1.5.1 Aktivierung und Ablauf des Signalweges	12
1.5.2 Transformierender Wachstumsfaktor- β in der Bronchopulmonalen Dysplasie	14
1.6 Epithelial-Mesenchymale Transition	15
1.7 Die Rolle der microRNAs	18
2 Hypothesen und Ziele	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Materialien	23
3.1.1 Geräte	23
3.1.2 Reagenzien	24
3.1.3 Zellkulturen	25
3.1.4 <i>Primer</i>	25
3.1.5 Antikörper	27
3.1.6 microRNA-mimics	28
3.2 Methoden	28
3.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen	28
3.2.2 Transfektion von Zelllinien und Primärzellen mit microRNA-mimics	29
3.2.3 Zellstimulation	29
3.2.4 RNA Isolation	30
3.2.5 Reverse Transkription	30
3.2.6 <i>Real time-RT-PCR</i>	31
3.2.7 Protein Isolation	32
3.2.8 <i>Sodium dodecyl sulfate (SDS)</i> -Elektrophorese und <i>western blot</i>	34

3.3 Statistik	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Expressionslevel von microRNA-322 und microRNA-497 im BPD-Modell.....	37
4.2 Filtern von microRNA-Zielgenen	39
4.3 Expression des ausgesuchten Zielgens von microRNA-322 in NIH-Zellen nach Transfektion	41
4.4 <i>Rarb</i> -Expression in transfizierten pulmonalen Mausfibroblasten	42
4.5 <i>In vivo</i> -Interaktion von microRNA-322 und <i>Rarb</i>	43
4.6 Transfektion von A549-Zellen mit microRNA-497 und die Auswirkungen auf Zielgentranskription	44
4.7 Prüfen der Übertragbarkeit veränderter <i>SMURF2</i> -Expressionslevel auf Proteinebene	45
4.8 Expression von Smurf2 im Lungenhomogenat von Mäusen des BPD- Modells.....	46
4.9 Folgen für die TGF- β Signalübertragung.....	47
4.9.1 Forcierte Expression beteiligter Gene	47
4.9.2 Enthemmte Aktivierung des TGF- β -Signalweges	50
4.10 Der Einfluss von TGF- β auf epitheliale Zellverbände	52
4.11 Veränderte EMT-Marker-Expression in murinen ATII-Zellen nach microRNA-497-Transfektion	55
5 Diskussion.....	56
5.1 Auswirkungen auf die Signaltransduktion der Retinsäure.....	56
5.2 Mitglieder der microRNA-15-Familie in der Bronchopulmonalen Dysplasie	58
5.3 Interaktion zwischen der microRNA-497 und ihrem Zielgen <i>SMURF2</i>	58
5.4 Disinhibition des TGF- β -Signals durch microRNA-497	60
5.5 Zellveränderungen nach microRNA-497 bedingter Disinhibition des TGF- β - Signalweges	62
6 Schlussfolgerung und Ausblick.....	66
7 Zusammenfassung	67
8 Summary.....	69
9 Abkürzungsverzeichnis.....	71

10 Abbildungsverzeichnis	75
11 Tabellenverzeichnis	76
12 Literaturverzeichnis	77
13 Erklärung zur Dissertation	92
14 Danksagung	93

1 Einleitung

Erkrankungen der Lunge spielen in allen Altersklassen eine Rolle und haben ganz unterschiedliche Ursachen. Immer öfter werden Noxen, wie Zigarettenrauch, insbesondere im höheren Alter nach längerer Exposition und allergische Reaktionen bereits ab der Kindheit oder Jugend als Komponenten genannt. In diesem Organ zeigen sich verschiedenste Pathologien, welche sowohl das Parenchym (akute inflammatorische Prozesse, chronisch entstandene Fibrosen oder bösartige Dysplasien), als auch z.B. Lungengefäße (Idiopathische pulmonale Hypertonie) betreffen. Eine häufige, sogar bei Laien, erste Assoziation zu Frühgeborenen, ist deren Problematik mit der Lunge. Verständlich wird diese, wenn man sich mit der Entwicklung und Reifung des Gewebes befasst und umso beeindruckender ist die physiologische Anpassung bei Geburt. Von einem Moment auf den anderen, besteht eine Anforderung an ein Organ, welches während neun Monaten Schwangerschaft noch nicht gebraucht wurde, da seine lebenswichtigen Aufgaben bisher durch die Plazenta erfüllt wurden.

1.1 Die menschliche Lunge und ihre Entwicklung

Die Entwicklung der Lunge kann man sich, vor allem in den frühen Phasen der Schwangerschaft, gut mit der Vorstellung eines wachsenden Baumes versinnbildlichen. In der Embryonalzeit entstehen die großen luftleitenden Abschnitte, indem sich ab der 3. Schwangerschaftswoche (SSW) eine Ausbuchtung des ventralen Vorderdarms immer weiter in das umgebende Mesoderm gräbt (Davis and Mychaliska 2013). Durch dichotome Teilungen ergeben sich zunächst drei Generationen an Bronchien, die später Haupt-, Lappen- und Segmentbronchien genannt werden. In der reifen Lunge sind, bis zu den Alveolen, 23 solcher Aufzweigungen erfolgt. Die Verbindung der Lungenknospe zu dem sich parallel entwickelnden Ösophagus wird durch das einsprossende Septum tracheoösophageale verschlossen (Mendelson 2000). Auch der Gefäßbaum beginnt sich in dieser Zeit auszubilden. Die sechste Kiemenbogenarterie bildet die Grundlage des *Truncus pulmonalis* und der *Arteriae pulmonales*, die Lungenvenen entspringen aus dem späteren linken Vorhof (Wert 2004).

Überschneidend bricht die erste von vier Phasen an, welche hauptsächlich in der Fetalperiode stattfinden. Zwischen der 5. und der 17. SSW hat die Lungenanlage - durch viele epitheliale Gänge und umgebendes Mesenchym - Ähnlichkeit mit einer tubulo-azinösen Drüse, was der pseudoglandulären Phase ihren Namen gibt. Wie auch in anderen Organsystemen, angeregt durch Zell-Zell- und Zell-Extrazellularmatrix-Interaktionen, steigt nun langsam der Grad der Differenzierung (Goldin and Wessells 1979, Minoo and King 1994). In der menschlichen Lunge lassen sich in der 13. SSW erstmals Flimmerepithelien nachweisen

1 Einleitung

(Adamson 1997). Die Zahl an Verästelungen nimmt immer mehr zu, sodass am Ende dieser Phase bereits die *Bronchioli respiratorii* erreicht werden (Kitaoka, Burri et al. 1996). Aus dem Mesenchym, welches ursprünglich ein Teil des Mesoderms ist, bilden sich nun die Knorpelspangen und -stücke zur Stabilisierung von Trachea und Bronchien (Davis and Mychaliska 2013).

In der kanalikulären Phase (16. - 26. SSW) verjüngt sich das Mesenchym zu Gunsten des sich ausbreitenden Kapillarnetzes. Auch durch das Abflachen des Epithels der Atemwege, wird die Gewebebarriere, welche später von den Gasen überwunden werden muss, immer schmaler (Wert 2004). Die vom Entoderm abstammenden, auskleidenden Zellen werden nun Pneumozyten Typ I genannt. Desweiteren sind Pneumozyten Typ II, die für die Surfactantbildung zuständig sein werden, schon an ihren Lamellarkörperchen erkennbar (Mendelson 2000).

Die Produktion des phospholipidhaltigen Surfactant beginnt in der folgenden sakkulären Phase (24. – 38. SSW), verbleibt allerdings noch auf einem geringen Level (Davis and Mychaliska 2013). Ansonsten werden diese Wochen v.a. durch die fortlaufende Entwicklung des respiratorischen Teils der Luftwege, also der *Ductus alveolares* und der *Sacculi alveolares*, bestimmt.

Kurz vor der Geburt (36. SSW) beginnt die alveolare Phase, in der durch Sprossung sekundärer Septen die Alveolen entstehen. Als Primärsepten wird die Wandung der Sacculi bezeichnet. Mit Hilfe von speziellen kontraktilen Fibroblasten, sogenannten Myofibroblasten, entsteht, durch Ausbeulung der Alveolarwände, eine Gewebeleiste, die durch Elongation der Zellen in den Luftraum einwächst (Yamada 2005). Die Kontraktilität wird durch die Expression von *α -smooth muscle actin* (α -SMA)¹ erreicht (Chen, Acciani et al. 2012). An den Spitzen der sprießenden Septen wird, ebenfalls mit Hilfe von Myofibroblasten, Elastin deponiert, was dem Gewebe die Fähigkeit der extremen Elastizität verleiht (Nakanishi 2007). Andersartig differenzierte Fibroblasten, die Lipofibroblasten, sind während der Entwicklung vor allem an der Basis der Sekundärsepten zu finden. Diese speichern überwiegend Triacylglycerol in Form von Lipidtröpfchen, was zur Synthese von Strukturproteinen, aber besonders zur Surfactantsynthese von den Alveolarepithelzellen Typ II benötigt wird (Schultz, Torres et al. 2002, Chen, Acciani et al. 2012). Der Prozess der Alveolarisierung endet, mit unterschiedlichen Aussagen je nach Quelle, erst um das zweite bzw. um das 8. oder sogar erst mit dem 18. Lebensjahr (Schittny, Mund et al. 2008). Ab dann findet nur noch eine Größenzunahme der rund 300 Millionen Lungenbläschen statt (Shannon and Hyatt 2004). Die anfangs paarig verlaufenden Kapillaren verschmelzen, sodass jede Kapillare je zwei Alveolen passiert

¹ Zur Konvention von Gen- und Proteinsymbolen bei Vertebraten siehe Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung

(Schittny, Mund et al. 2008). Die Blut-Luft-Schranke ist, nach Verschmelzen der Basalmembranen der Pneumozyten und des Endothels, nur noch wenige Nanometer breit (Davis and Mychaliska 2013).

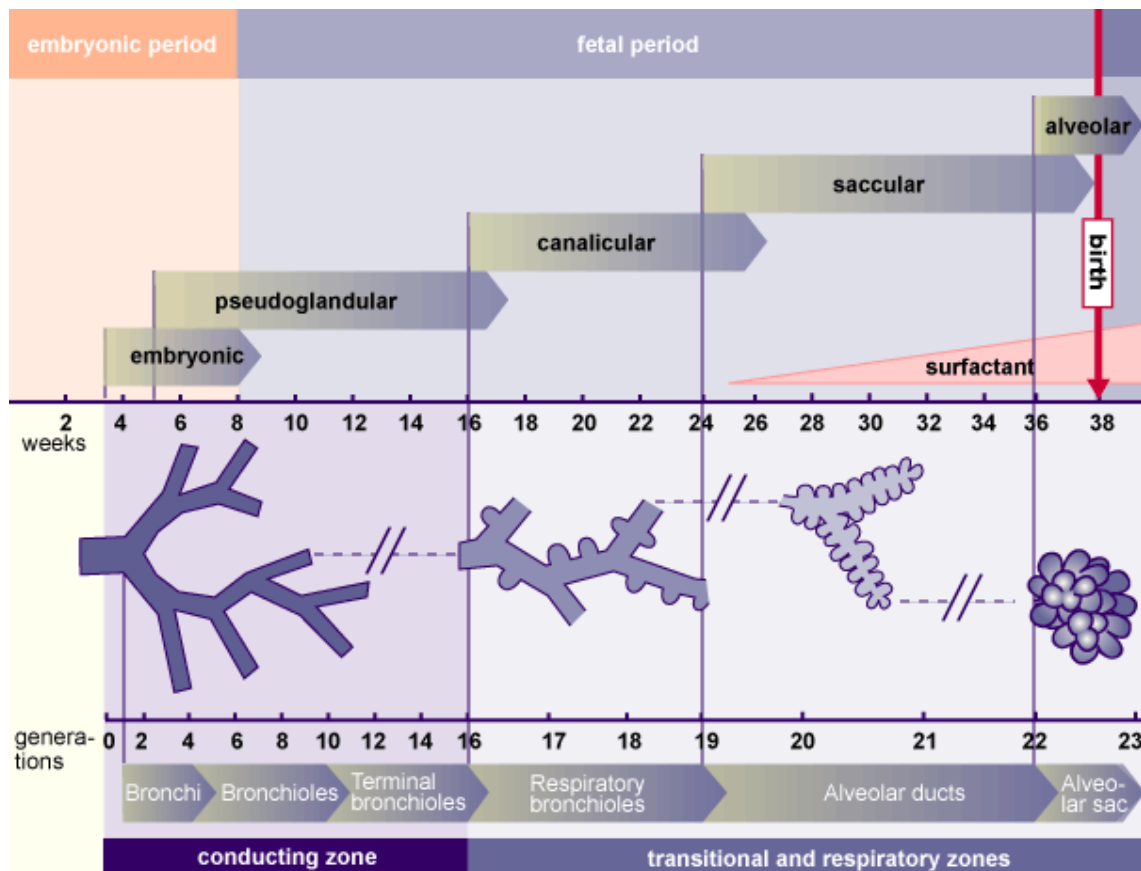


Abbildung 1 Die vorgeburtliche Lungenentwicklung

Die vorgeburtliche Lungenentwicklung wird in 5 Phasen (embryonal, pseudoglandulär, kanalikulär, sakkulär, alveolar) eingeteilt. Mit fortschreitendem Schwangerschaftsalter (weeks; obere Leiste), steigt auch die Anzahl von Verzweigungen (generations) der luftleitenden Wege (conducting zone), bis auch die gasaustauschenden Regionen (transitional and respiratory zones) erreicht werden (untere Leiste). Wobei die Ausbildung der Alveolen erst nach der Geburt (birth) vollendet wird. Besonders wichtig in den letzten Entwicklungswochen ist die beginnende, sich vermehrende Produktion der oberflächenaktiven Substanz Surfactant (embryology.ch) (25.8.15). "<http://www.embryology.ch/allemand/rrespiratory/phasen07.html>".

1.2 Unterschiede zur Maus

Weiterhin wird versucht durch Forschung mehr Detailwissen über die Physiologie, aber auch deren pathologischen Fehlentwicklungen zu erlangen. Das in der Wissenschaft gerne verwendete Mausmodell bietet sich auch in Bezug zur Lunge an. Es bestehen kaum Unterschiede in der Entwicklung, abgesehen vom zeitlichen Verlauf, der sich aus der wesentlich kürzeren Schwangerschaftsdauer, von nur ca. 21 Tage, ergibt. Desweiteren werden die Mäuse bereits in der sakkulären Entwicklungsphase der Lunge geboren, nicht wie die Menschen erst im alveolären Stadium (Have-Opbroek 1991, Londhe, Maisonet et al. 2013). Dies ist äußerst nützlich in der Erforschung der Bronchopulmonalen Dysplasie, welche als Folge

1 Einleitung

von Frühgeburtlichkeit entstehen kann und so die Untersuchung von Lungen in unreiferen Stadien erfordert.

Embryonale Phase	embryonaler Entwicklungstag (ET) 9,5 – 11,5
Pseudoglanduläre Phase	ET 11,5 – 16,5
Kanalikuläre Phase	ET 16,5 – 17,5
Sakkuläre Phase	ET 17,5 – 5. postnataler Tag
Alveoläre Phase	5. – 30. postnataler Tag

(Alejandre-Alcázar 2007, Kool, Mous et al. 2014)

1.3 Bronchopulmonale Dysplasie

Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine Erkrankung, die seit nun fast 50 Jahren eine wichtige Komplikation in der Behandlung unreifer Frühgeborener darstellt, obgleich sich ihr Pathomechanismus durch veränderte „Umwelt“ der Kinder gewandelt hat. Man unterscheidet zwischen der klassischen Form und der neuen Form der BPD. Die klassische BPD wurde erstmals 1967 von Northway et al. beschrieben (Wilson 2010), als eine v.a. durch Sauerstoffgabe und maschinelle Beatmung entstandene Schädigung der Lunge, welche zu anhaltender Atemnot Frühgeborener auch nach der Neugeborenenperiode führt. Bei dieser Definition entscheidend war die röntgen-radiologische Darstellung von Fibrosen, sowie linearen Transparenzminderungen, welche Atelektasen abbilden, aber auch von überblähten Bereichen, die als strahlendurchlässige, zystische Gebilde erscheinen. Frühe Folgeschäden konnten nicht nur eine eingeschränkte Lungenfunktion sein, sondern auch eine, teilweise persistierende, pulmonale Hypertension (Northway 1990). Über die Jahre gab es immer wieder neue Ideen die BPD zu definieren. Zum Beispiel mit Anlehnung an Northway diagnostizierte Bancalari BPD bei allen Kindern, die bis nach dem 28. Lebenstag Sauerstoff von >21% atmeten, diesen also als Therapie erhielten, und auch entsprechende röntgenologische Auffälligkeiten zeigten (Bancalari, Abdenour et al. 1979). Da die Patienten allerdings durch unterschiedliche Geburtszeitpunkte nicht vergleichbar waren, entschieden Shennan und Kollegen eine Diagnose, weiterhin abhängig von der Sauerstofftherapie, erst im postmenstruellen Alter von 36 Wochen zu stellen (Shennan 1988).

Die Häufigkeit der Neuerkrankung bei Frühgeborenen <28. SSW oder einem Geburtsgewicht von <1000g liegt bei 15-30% (gnpi.de). Durch Weiterentwicklung der Behandlung von Frühgeborenen, wie neue Beatmungsstrategien, Glukokortikoidtherapie zur Lungenreifung pränatal und die Einführung von Surfactantgabe postnatal, hat sich die Pathophysiologie und auch

1 Einleitung

das Patientenkontingent, jedoch nicht die Inzidenz, insgesamt verändert. Es überleben nun immer mehr sehr unreife Kinder, die in der 24.-26. SSW mit unter 1000g Gewicht geboren werden (De Paepe, Mao et al. 2006). Die Ursachen der Erkrankung sind die extreme Unreife der Lunge selbst zusammen mit weiteren multiplen Faktoren. Dazu gehören anhaltende Hyperoxie, welche bei der eigentlich fetalen Lunge bereits bei 21% O₂ besteht, künstliche Beatmung, perinatale Infektionen und vermutlich genetische Disposition (Bancalari 2003, Vicencio, Lee et al. 2004, Coalson 2006).

Die neuste Definition aus dem Jahr 2001, die aus einer Konsensuskonferenz des *National Institute of Child Health and Human Development* (NICHD) und des *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHLBI) zusammen mit dem *Office of Rare Diseases* (ORD) hervorging, besagt, dass alle Kinder, die mindestens 28 Tage zusätzlichen Sauerstoff benötigten, an einer BPD leiden. Um eine Aussage über die Schwere der Erkrankung zu treffen, muss eine Wiederbeurteilung anhand der *fraction of inspired oxygen* (FiO₂) nach der eigentlichen 36. SSW oder bei Entlassung erfolgen (Landry 2011, Kool, Mous et al. 2014). Wobei man hier noch beachten muss, dass Frühgeborene, die erst nach der 32. SSW geboren wurden, frühestens bei Entlassung, aber spätestens am 56. Lebenstag eingestuft werden (Jobe and Bancalari 2001). Eine nur milde BPD besteht, falls die Kinder nun ohne zusätzlichen Sauerstoff eine ausreichende Sättigung von 85-95% aufweisen. Bei einer FiO₂ bis zu 0.3 (entspricht 30% O₂ in der Inspirationsluft) handelt es sich um die moderate Form, wohingegen jede FiO₂ über 0.3 oder wenn eine Atemunterstützung, wie z.B. CPAP (*Continuous Positive Airway Pressure*), erforderlich ist/bleibt, eine schwere BPD definieren. Bildgebende Maßnahmen werden nicht herangezogen, da sie, wenn nicht anderweitig vonnöten, gerade bei so jungen Patienten vermieden werden sollten.

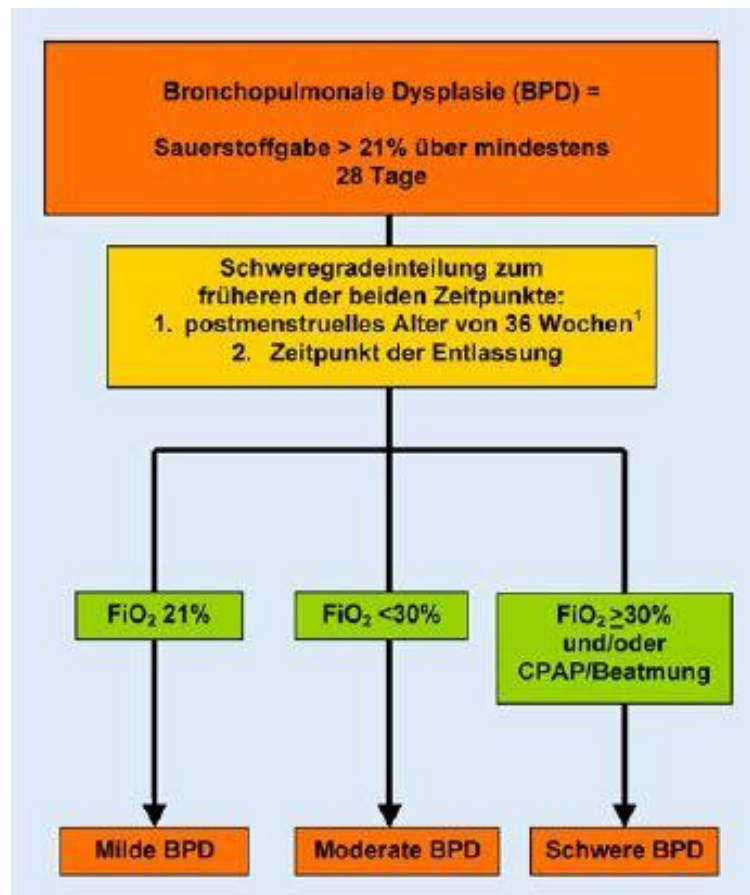


Abbildung 2 BPD-Definition laut NIH

Definition der BPD laut NIH und Einteilung in drei Schweregrade –mild, moderat und schwer- bei Kindern geboren vor der 32.SSW im postmenstruellen Alter von 36 Wochen oder bei Entlassung, abhängig von der inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) und/oder ob die Kinder *continuous positive airway pressure* (CPAP) als Atemunterstützung oder eine Form der Beatmung erhielten.¹Bei Geburt erst nach der 32.SSW erfolgt die Einstufung nicht vor dem 56. Lebensstag, außer das Kind wird vorher entlassen (Thomas and Speer 2005).

Pathophysiologisch resultiert ein - wohl teils reversibler - Stillstand der Alveolarisierung durch gestörte sekundäre Septierung (Thomson, Yoder et al. 2004, Coalson 2006) und eine abnorme Struktur der Mikrovaskulatur (Bhatt, Pryhuber et al. 2001). Bei der alten Form kam es hingegen „nur“ zu einem verlangsamten Wachstum der größtenteils bereits entwickelten Alveolen (Northway 1990). Die, wenn auch nicht mehr so stark ausgeprägte, Fibrosierung der Septen zusammen mit der Hypoplasie der Alveolen führt zu einer verdickten Blut-Luft-Schranke und zu einer geringeren Gasaustauschfläche (De Paepe, Mao et al. 2006, Alejandre-Alcázar 2007, Zysman-Colman MD 2013). Kapillaren erscheinen dilatiert und durch ungenügende Verzweigung ist der Gefäßbaum nicht ausreichend dicht. Weiterhin bleibt teilweise das primitive doppelläufige Kapillarmuster erhalten (De Paepe, Mao et al. 2006, Hadchouel, Franco-Montoya et al. 2014).

1 Einleitung

Sauerstoff spielt natürlich weiterhin eine große Rolle in der Therapie von Frühgeborenen mit Atemstörungen egal welcher Genese. Unter Beachtung verschiedener Studien zu assoziierten Themen, wie Frühgeborenenretinopathie, zerebralem *Outcome* und künftiger Lungenfunktion, wurde empfohlen den Sättigungszielbereich zwischen 93-98% anzuordnen (Thomas and Speer 2005). Zur Beatmung sollten wenn möglich wenig invasive, lungenprotektive Verfahren, wie CPAP (*continuous positive airway pressure*) oder HFO (Hochfrequenzoszillation), angewandt werden. Auch alle weiteren Hinweise zum Umgang mit diesen Patienten, ob in Bezug auf Flüssigkeitshaushalt, Ernährung oder Prophylaxe, sind allgemein gehalten und es muss individuell entschieden werden, welche Behandlung erfolgt (gnpi.de). Dies zeigt, dass weiterhin Interesse und Bedarf an der Erforschung der Bronchopulmonalen Dysplasie besteht. Eine klinisch interessante und experimentell viel untersuchte, allerdings noch nicht im Detail belegte und so immer wieder diskutierte Option, ist die intramuskuläre Applikation von Vitamin A. Die biologische Wirkung ist stark abhängig von Faktoren wie Zeitpunkt, Dosierung, Gewebeart und aktivierten Rezeptoren. Darin liegt die Schwierigkeit, eine eindeutige Aussage zu treffen, begründet. Durch die Gabe von Retinsäure, einem Derivat des Vitamin A, kann die Alveolarisierung negativ beeinflusst werden (Maden and Hind 2004), aber in emphysematösen Rattenlungen die Zahl der Alveolen regeneriert und so v.a. die Oberfläche gesteigert werden (McGowan, Jackson et al. 2000). Modifiziert wird auch die Zelldifferenzierung und Surfactantbildung. Außerdem übt Retinsäure antioxidative Effekte auf Sauerstoffradikale aus (Veness-Meehan, Pierce et al. 2002, Cho, George et al. 2005). Regulierend auf die inflammatorische Komponente von Krankheiten einwirken können Retinoide über Interferenzen mit dem Immunsystem (Maden and Hind 2004). Tyson et al. konnten durch Gabe von Vitamin A das Risiko für chronische Lungenerkrankungen und gleichfalls für den Tod von extrem kleinen Frühgeborenen signifikant senken (Tyson, Wright et al. 1999). Da anscheinend keine gravierend negativen Auswirkungen auf z.B. das neurologische *Outcome* (untersucht mit ca. 20 Monaten) zu erwarten sind (Ambalavanan, Tyson et al. 2005), wird die Applikation in den Leitlinien der Gesellschaften für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) bzw. für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ), welche momentan gerade überarbeitet werden, bisher als Prophylaxe vorgeschlagen (gnpi.de).

1.4 Vitamin A und Retinoide

Vitamin A, chemisch als Retinol bezeichnet, und seine Derivate, die sogenannten Retinoide, setzen im gesamten Organismus an verschiedenen Geweben, zu diversen Zeitpunkten, grundlegende Effekte in Gang. Hierzu gehören die embryonale Organogenese, spätere Gewebedifferenzierung, Zellproliferation, aber auch Apoptose (Mark, Ghyselinck et al. 2006).

1 Einleitung

Hale hat bereits 1933 von den Folgen des Vitamin A-Mangels für die Augenentwicklung berichtet und bis heute weiß man, dass neben dem Herz-Kreislauf- und Urogenitalsystem auch die Lunge von Fehlbildungen betroffen ist (Mendelsohn, Lohnes et al. 1994). Essentiell sind diese Verbindungen ebenfalls für postnatale Prozesse in Kortex und Lunge (Maden and Hind 2004, Ambalavanan, Tyson et al. 2005). Nun stellt sich die Frage, wie der Signalweg einer Stoffklasse so vielfältige, teils gegensätzliche Auswirkungen haben kann. Einen entscheidenden Beitrag leisten hier mehrere aktive Metabolite und vor allem die beteiligten Rezeptoren.

1.4.1 Metabolismus

Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin A wird als Retinylester im Blut transportiert und in der Leber gespeichert. Durch Hydrolyse entstandenes Retinol wird, an *retinol binding protein* (RBP) gebunden, zu den Zellen des Zielorgans transportiert (Kam, Deng et al. 2012). Dort wird es wiederum durch *cellular retinol binding protein* (CRBP) entweder, geschützt vor unspezifischer Oxidation, gelagert oder zur Weiterverarbeitung speziellen Enzymen präsentiert (Penzes and Napoli 1999). Über mehrere Zwischenschritte entsteht 11-*cis*-Retinal, das für den Sehprozess von zentraler Bedeutung ist (Mata, Moghrabi et al. 2004, Kam, Deng et al. 2012). Der für die embryonale Entwicklung und somit in dieser Arbeit relevantere Metabolit, ist die *all-trans* Retinsäure (ATRA) (Niederreither, Subbarayan et al. 1999). Mit Hilfe der Retinolhydrogenase wird Retinol zu *all-trans*-Retinal (ATRAL) und kongruent oxidiert Retinaldehydhydrogenase ATRAL zu ATRA (Dowling and Wald 1960, Duester 2000). Im Folgenden wird ATRA durch *cellular retinoic acid binding proteins* (CRABP), vor dem Abbau durch CYP26 geschützt (Sakai, Luo et al. 2004, Takeuchi, Yokota et al. 2011), in den Zellkern gebracht, wo es mit Hilfe der Rezeptoren seine Wirkung entfalten kann (Sessler and Noy 2005).

1.4.2 Rezeptoren

Wie andere lipophile Liganden und Hormone (z.B. Vitamin D₃, Schilddrüsen- und Steroidhormone), aktivieren Vitamin A und seine Derivate intrazelluläre Rezeptoren. Der *retinoic acid receptor* (RAR) und der *retinoid receptor* (RXR) entfalten ihre Wirkung meist als Heterodimer, kombiniert aus den jeweiligen Isotypen α , β und γ (Chambon 1996). Homodimere haben im klassischen Signalweg einen geringeren Stellenwert, was z.B. mit ihrer weniger bevorzugten Bindung zueinander und anschließend auch an entsprechende DNA-Elemente erklärt werden kann (Durand, Saunders et al. 1992, Nagpal, Friant et al. 1993). Die Dimerisierung wird durch die Regionen C und E ermöglicht, wobei Region C desweiteren eine DNA-bindende-Domäne (DBD) und Region E sowohl die Liganden-bindende-Domäne (LBD), als auch eine Bindungsstelle für *transcriptional silencing corepressors* und die liganden-abhängige *transcriptional activation function* (AF-2) besitzt (Chambon 1996, Mark,

1 Einleitung

Ghyselinck et al. 2006). Eine liganden-unabhängige *transcriptional activation function* (AF-1) beinhalten die aminoterminalen Regionen A und B. Hier finden sich auch die strukturellen Unterschiede der Isotypen und Isoformen (z.B. RAR- α -1/2, - β -1-4 und - γ -1/2) der Rezeptoren (Nagpal, Friant et al. 1993). Wohl weitestgehend unbekannt sind die Aufgaben der Regionen D und F (Chambon 1996). Nachdem der Ligand, welcher für RAR sowohl ATRA, als auch 9-*cis*-RA und für RXR nur 9-*cis*-RA darstellt, gebunden ist (Nagpal, Friant et al. 1993, Kam, Deng et al. 2012), werden zuvor assoziierte Corepressoren freigesetzt und hierdurch die Bindung von Coaktivatoren ermöglicht (Mark, Ghyselinck et al. 2006). Nun kann, über Zinkfinger in der Region C, Kontakt zur DNA, genauer zu *RA responsive elements* (RARE), hergestellt werden (Nagpal, Friant et al. 1993, Kam, Deng et al. 2012). Bei RARE handelt es sich um spezielle Basenmotive in den regulatorischen Bereichen der Zielgene (Leid, Kastner et al. 1992). Neben den bereits genannten Punkten die zur Diversität der Wirkung von Retinoiden beitragen, wie die verschiedenen Metabolite und mehrere Rezeptorkombinationen, ist auch noch erwähnenswert, dass die isotypenspezifischen AF-1 Regionen auch zelltyp-abhängig und entwicklungsstadien-abhängig sind (Chambon 1996). Zudem verfügt RXR über die Fähigkeit andere Signalwege, auch die membranständiger Rezeptorsysteme, zu modulieren (Chambon 1996, Mark, Ghyselinck et al. 2006, Kam, Deng et al. 2012).

1 Einleitung

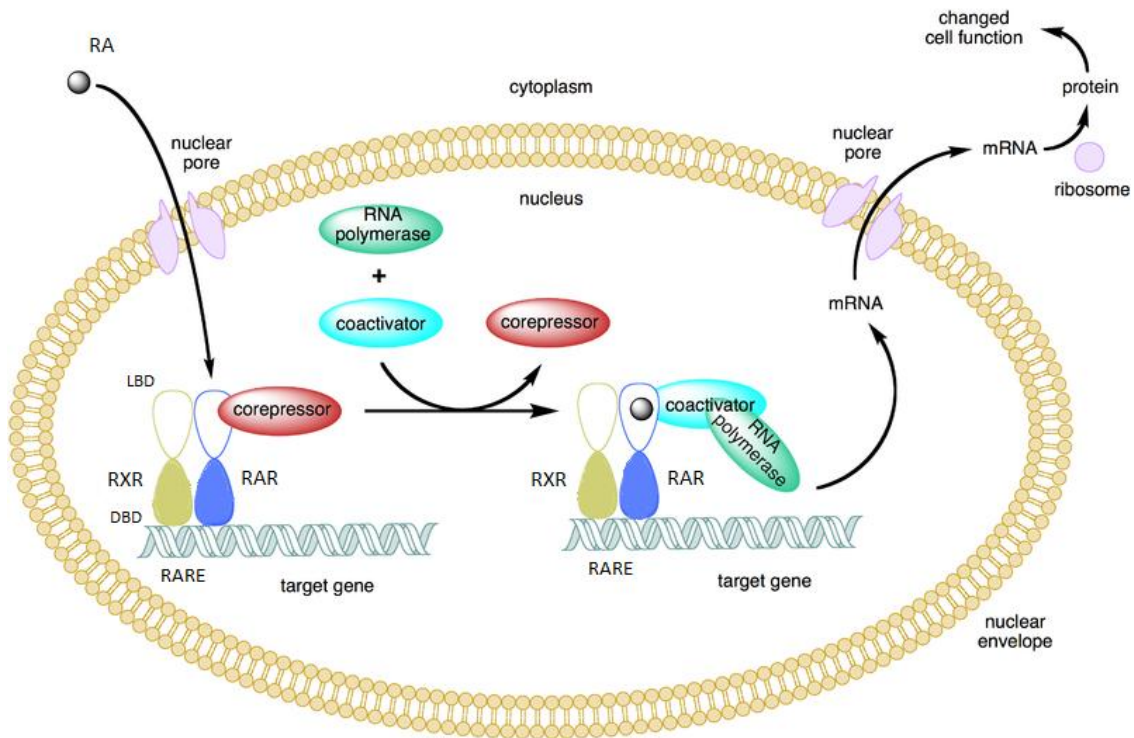


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Retinsäure-Signalweg

Retinsäure (retinoic acid, RA) gelangt über Poren in den Nukleus und bindet dort über die LBD (Liganden-bindende-Domäne) an seinen Rezeptordimer, bestehend aus RAR (retinoic acid receptor) und RXR (retinoid receptor). Daraufhin werden Corepressoren entlassen und Coaktivatoren angelagert. Der Kontakt zwischen DBD (DNA-bindende-Domäne) der Rezeptoren und RARE (RA responsive elements) der Promotorregion des Zielgens, ermöglicht die Transkription durch eine RNA-Polymerase. Das Protein, welches im Zytoplasma mit Hilfe von Ribosomen durch Transkription der mRNA entsteht, kann nun besagte Effekte auslösen (wikipedia.org) (14.08.15).

["https://de.wikipedia.org/wiki/Kernrezeptor#/media/File:Type_ii_nuclear_receptor_action.png"](https://de.wikipedia.org/wiki/Kernrezeptor#/media/File:Type_ii_nuclear_receptor_action.png) (modifiziert).

1.4.3 Beeinflussung der Lungenentwicklung

Mittlerweile seit Jahrzehnten bekannt und durch mehrere Untersuchungen belegt, beeinflusst der RA-Signalweg die embryonale Entwicklung (Dickman, Thaller et al. 1997, Malpel, Mendelsohn et al. 2000). Dies gilt sowohl für zu hohe Dosen von RA, welche teratogene Wirkung zeigen (Shenefelt 1972), als auch für den Mangel daran. Beispiele für Letzteres sind das PAGOD- und das Matthew-Wood-Syndrom (Golzio, Martinovic-Bouriel et al. 2007, Gavrilo, Babovic et al. 2009). Beide sind neben Herz-, Augen- und diaphragmalen Fehlbildungen, auch über Lungenanomalien definiert. Durch Verändern der Synthese bzw. des Abbaus von RA oder durch Inaktivieren der Rezeptoren (Desai, Chen et al. 2006, Chen, Cao et al. 2010), konnte in Studien mit Mäusen gezeigt werden, dass gerade in der frühen Organogenese, bei der Sprossung der Lungenknospen aus dem Vorderdarm, RA wichtige Gene aktiviert. Zu späteren Zeitpunkten finden sich allerdings physiologisch ebenfalls sinkende RA-Level, gerade in distalen Lungenabschnitten (Malpel, Mendelsohn et al. 2000). Zur Ausdifferenzierung der Alveolarzellen ist eine Drosselung des RAR- α -Signals notwendig

(Wongtrakool, Malpel et al. 2003), obwohl andere Komponenten des Signalweges eben genau hierfür bedeutsam sind (Cho, George et al. 2005) und auch postnatal erneut Retinoide zur Alveolarisierung und Reifung benötigt werden (Londhe, Maisonet et al. 2013). Gespeichert werden sie direkt vor Ort in pulmonalen Lipofibroblasten, die ebenso für die Bereitstellung von Surfactantlipiden zuständig sind (Londhe, Maisonet et al. 2013). Seitendifferenzen in der Lungenentwicklung, mit teils unilateraler pulmonaler Hypoplasie, können auf Disbalancen von RA und seinen Rezeptoren zurückgeführt werden (Mendelsohn, Lohnes et al. 1994, Desai, Chen et al. 2006). Zielmoleküle von RA, wie der immer wieder erwähnte *fibroblast growth factor 10* (FGF10), werden anscheinend sowohl direkt, als auch indirekt reguliert oder agieren, nach anfänglicher Aktivierung, sogar unabhängig (Desai, Chen et al. 2006, Chen, Cao et al. 2010). *Transforming growth factor-β* (TGF-β) und der Ligand Wnt stellen bei der indirekten Regulation der Lungenentwicklung wichtige zwischengeschaltete Modulatoren dar. Wobei Wnt-Signale FGF10 induzieren, TGF-β jedoch hemmend auf die FGF10-Expression und so gleichermaßen auf die frühe Lungenentwicklung wirkt (Chen, Cao et al. 2010). Die Überschneidung der Pfade von RA und TGF-β, sowie deren Beziehung zur Alveolarentwicklung, waren bereits Thema einiger Studien (Londhe, Maisonet et al. 2013).

1.5 Transformierender Wachstumsfaktor - β

Der *transforming growth factor-β* ist ein zur gleichnamigen Familie gehörendes Zytokin, dessen Signaltransduktion u.a. durch erhöhten Sauerstoffpartialdruck gesteigert wird. So können auch im Bronchialsekret von Frühgeborenen mit BPD erhöhte Level von TGF-β nachgewiesen werden (Alejandro-Alcázar 2007, Nakanishi 2007). In seiner aktiven Form liegt er als Homodimer vor, welches neben hydrophoben Wechselwirkungen, v.a. durch drei Disulfidbrücken zwischen Resten der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein zusammengehalten wird (Shi 2003). Andere Mitglieder dieser Familie sind z.B. *bone morphogenic protein* (BMP), *growth and differentiation factor* (GDF) und verschiedene Activine. Sie alle regulieren entscheidende Zellprozesse wie Wachstum, Differenzierung und ebenso Zelltod (Massagué 1998). Die Untergruppe mit den Isoformen TGF-β 1/2/3, auf welche im Folgenden ein Augenmerk gelegt wird, führt speziell in Epithelien eher zu einem Zellzyklusarrest, wohingegen in mesenchymalen Zellen ein positiver Effekt auf das Zellwachstum erzielt wird. Desweiteren ist ihr Signalweg an der Wundheilung und der Immunsuppression beteiligt (Roberts and Sporn 1993). Neben dem hier beschriebenen klassischen Signalweg, kann TGF-β zusätzlich über weitere Wege, wie den *MAP* (mitogen-activated protein)-*Kinase*-Signalweg oder *Rho-like GTPase signaling pathway* agieren (Zhang 2009).

1.5.1 Aktivierung und Ablauf des Signalweges

Die TGF- β -Rezeptor-Familie besteht aus Transmembranproteinen mit C-terminaler Serin/Threonin-Kinaseaktivität. Im Menschen wurden bisher sieben Rezeptoren vom Typ I und fünf vom Typ II beschrieben. Hier relevante Vertreter jeder Gruppe sind TGF- β -Rezeptor-I (T β R-I) und T β R-II. Es handelt sich um Glykoproteine (ca. 500 Aminosäuren), deren extrazelluläres N-terminales Ende die Ligandenbindungsstelle aufweist (Mathews and Vale 1991, Attisano, Wrana et al. 1992, Manning, Whyte et al. 2002). Nur der Typ I-Rezeptor weist N-terminal, angrenzend an die Kinase-Domäne, eine sogenannte GS (Glycin/Serin)-Domäne auf. Sie beinhaltet die typische SGSGSG-Sequenz, an welcher Typ I-Rezeptoren, wie weiter unten beschrieben, durch Typ II-Rezeptoren phosphoryliert werden (Wrana, Attisano et al. 1994).

Wenn nun TGF- β als Ligand an T β R-II, zu dem er eine hohe Affinität besitzt (Shi 2003), bindet, folgt auch die Anlagerung von T β R-I. Genauer gesagt entsteht sogar ein Heterotetramer-Komplex aus je zwei T β R-I und T β R-II, vermutlich 1:1 gebunden an die Monomere des Dimerliganden (Cheifetz, Weatherbee et al. 1987). Wie so oft kann diese Reaktion natürlich durch andere regulierende Moleküle, hier z.B. Betaglykan oder Endoglin, die man auch als akzessorische Rezeptoren vom Typ III bezeichnet, erleichtert oder erschwert werden (Wang, Lin et al. 1991, Massagué 1998). Überhaupt erst möglich ist das Zusammenkommen des Rezeptorkomplexes nach Dissoziation von LAP (*latency-associated protein*) und LTBP (*latent TGF- β - binding protein*) (Adamson 1997). *Latency-associated protein* ist Teil des TGF- β Propeptides und bleibt zunächst nichtkovalent gebunden (Gentry, Webb et al. 1987). Über Disulfidbrücken ist LAP mit LTBP verknüpft, das nun schließlich das ruhende TGF- β -Dimer durch fibrillin-ähnliches *cross-linking* in der Extrazellulärmatrix verankert (Miyazono, Ichijo et al. 1993). Vor der liganden-unabhängigen, fehlerhaften Aktivierung des Signalwegs schützt FKBP12, ein Immunophilin, durch Verlegung der zytoplasmatischen Domäne von T β R-I (Wang, Li et al. 1996).

Kommt es nun zur regelrechten Aktivierung, phosphoryliert T β R-II den Typ I Rezeptor an Serin- und Threoninresten. Nach Aufnahme im frühen Endosom wird, mit Hilfe des rezeptor-assoziierten Proteins SARA (*SMAD anchor for receptor activation*) und der Kinaseaktivität von T β R-I, SMAD2 (*small mothers against decapentaplegic*) oder SMAD3 phosphoryliert (Willis and Borok 2007).

Die SMAD-Proteine übernehmen also u.a. Aufgaben im intrazellulären Signalweg von TGF- β . Man kann sie untergliedern in drei verschiedene Gruppen, die rezeptorassoziierten R-SMADs (SMAD2 und SMAD3 Mediatoren von TGF- β und ACTIVIN; SMAD1, SMAD5 und SMAD8 Mediatoren von BMP) (Graff, Bansal et al. 1996), sowie Co-SMAD4, das im Kom-

1 Einleitung

plex mit R-SMADs als eine Art Transkriptionsfaktor fungiert (Kretzschmar, Liu et al. 1997) und schließlich inhibitorische I-SMADs (SMAD6 inhibiert bevorzugt den BMP Signalweg, SMAD7 hemmt sowohl TGF- β , als auch BMP) (Graff, Bansal et al. 1996, Nakao, Afrakhte et al. 1997). Die N-terminale MH1-Domäne von R- und Co-SMADs inhibiert im Ruhezustand die MH2-Domäne (Liu, Hata et al. 1996) bzw. sorgt bei Aktivierung für die DNA-Bindung (Liu, Pouponnot et al. 1997). Innerhalb der C-terminale MH2-Domäne werden die R-SMADs vom Typ I-Rezeptor phosphoryliert (Kretzschmar, Liu et al. 1997) und bei Co- und I-SMADs übernimmt dieser Abschnitt die Effektorfunktion, also entweder die Assoziation mit den R-SMADs bzw. mit DNA-bindenden Faktoren oder die Inhibition (Topper, Cai et al. 1997). Die Region zwischen den Domänen ist nicht so stark konserviert, also variabler in Frequenz und Größe. Trotzdem kann es durch Interaktionen dieser Region von R-SMADs, z.B. mit der MAP-Kinase (hierdurch wird der Transport zum Zellkern gehemmt) (Kretzschmar, Doody et al. 1997) oder SMURF (SMAD ubiquitination regulatory factor 1/2)-Proteinen (genaue Erläuterung folgt weiter unten), zu bedeutenden Veränderungen des TGF- β -Signalweges kommen.

SMAD anchor for receptor activation besitzt Bindedomänen für sowohl die R-SMADs, als auch den Rezeptor und kann infolgedessen das Zusammenkommen beider veranlassen (Runyan, Hayashida et al. 2009). Phosphorylierte R-SMADs treffen im Zytoplasma auf SMAD4 und gelangen als Komplex zum Zellkern. Auch beim Transport durch die Kernporen sind wieder die MH-Domänen beteiligt (Shi 2003, ten Dijke 2004). Im Folgenden können Zielgene verstärkt exprimiert oder auch deren Expression verhindert werden. Hierzu binden SMADs entweder direkt an die Regulatorregionen der DNA oder es werden andere Transkriptionsfaktoren zwischengeschaltet (Massagué 1998). Dephosphorylierung der R-SMADs führt zur Dissoziation des Komplexes und ermöglicht somit den Export von R-SMADs ins Zytoplasma, wo sie allerdings bei immer noch bestehendem oder erneutem Rezeptorsignal rephosphoryliert werden können (Inman, Nicolás et al. 2002). Zudem kann es aber genauso durch Ubiquitinierung zum Abbau im Proteasom kommen. Die hierfür benötigten Enzyme heißen SMURF1 bzw. SMURF2 und gehören zur Familie der E3 *ubiquitin protein ligases* (Zhang 2001). SMURF1 kommuniziert überwiegend mit SMAD1 und SMAD5 (Zhu, Kavsak et al. 1999), wobei SMAD2 und SMAD3 mit der Hilfe von SMURF2 aus dem Verkehr gezogen werden. Inwiefern SMURF2 selbstständig zu dieser Degradation führt oder welche Hilfsmoleküle benötigt werden ist noch nicht geklärt (Eichhorn 2013). Allerdings kann zumindest die Komplexbildung, durch Ubiquitinierung von z.B. SMAD3, behindert werden (Tang, Yamashita et al. 2011).

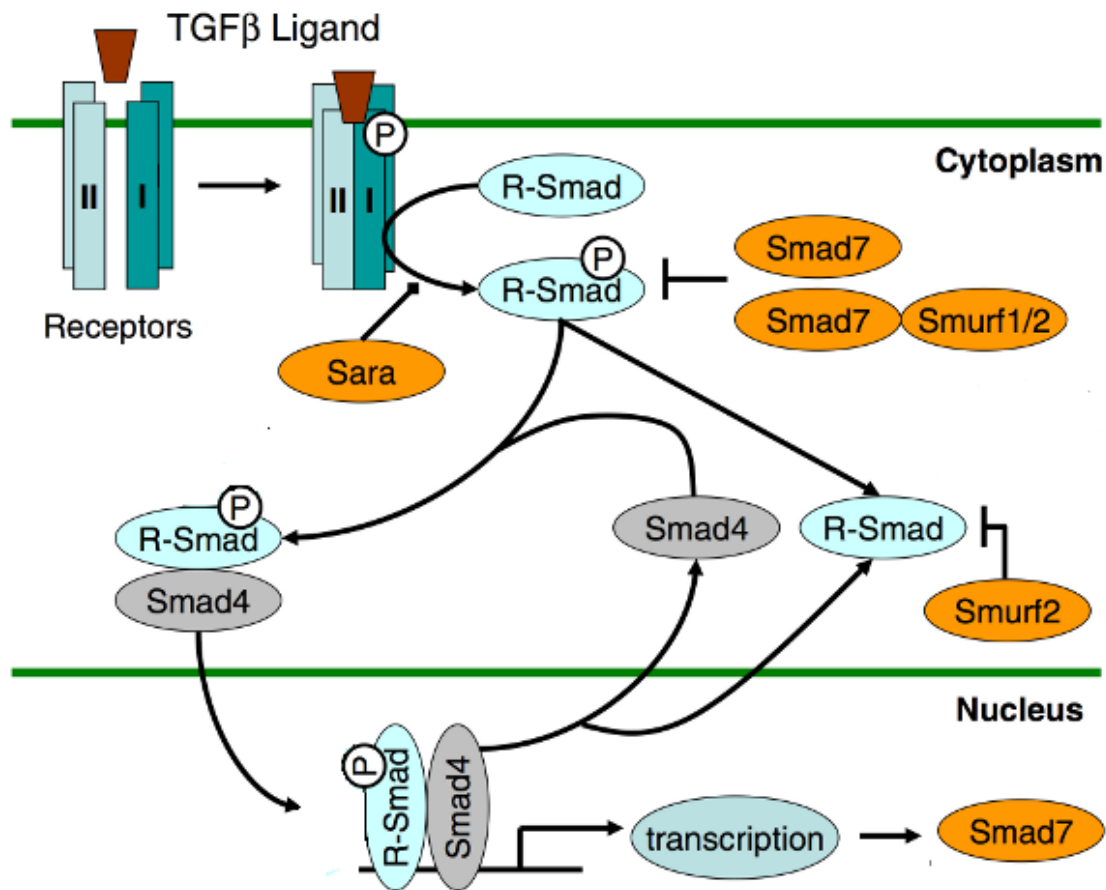


Abbildung 4 Schematische Darstellung des TGF- β -Signalwegs

Schematische Darstellung des TGF- β -Signalwegs. Der Ligand TGF- β bewirkt, nach Tetramerbildung und Phosphorylierung (P) des Rezeptorkomplexes, auch die Phosphorylierung von R-Smads (rezeptorassoziierte Smad-Proteine), was durch Sara (*Smad anchor for receptor activation*) moduliert wird. Aktivierte R-Smads gelangen nach Zusammenlagern mit Smad4 in den Nucleus. Hier beeinflusst der Komplex die Genexpression. Eine negative Feedbackschleife entsteht durch Expression von Smad7. Als weitere Inhibitoren greifen Smurf-Proteine an verschiedenen Stellen des Signalweges an (Wegner, Bachmann et al. 2012) (modifiziert).

Zusätzlich beeinflussen SMURFs den TGF- β -Signalweg noch in anderer Weise. Durch eine negative Feedbackschleife wird bei TGF- β Aktivierung zunächst I-SMAD7 stärker exprimiert, welches dann anschließend im Nucleus über sein PY-Motiv Kontakt zur WW-Domäne von SMURF aufnimmt und es so zum aktivierten T β R-I befördert (Wiesner, Ogunjimi et al. 2007, Yan and Chen 2011). SMURF ubiquitiniert den Rezeptor durch die C-terminale HECT (*homology to E6AP carboxyl terminus*)-Domäne und bewirkt seinen Transport zu Lysosomen oder Proteasomen mittels Endozytose in caveolin-positiven Vesikeln (Kavsak 2000, Ebisawa, Fukuchi et al. 2001).

1.5.2 Transformierender Wachstumsfaktor- β in der Bronchopulmonalen Dysplasie

Die verschiedenen Auswirkungen von TGF- β verdeutlichen, dass es in den Naturwissenschaften häufig nicht nur um das Auftreten oder Fehlen von Molekülen oder ganzen Phänomenen geht, sondern um die Balance jedes Einzelnen. So findet die Alveolarisierung in der späten Lungenentwicklung ganz ohne TGF- β nicht regulär statt (Chen, Sun et al. 2005), je-

doch wird diese ebenfalls von zu viel TGF- β gestört (Vicencio, Lee et al. 2004), was man auch in der BPD beobachten kann. Beispielsweise wird die Proliferation von Alveolarepithelzellen Typ II (ATII-Zellen) von TGF- β behindert (Konigshoff, Kramer et al. 2009), die allerdings ein relevanter Prozess ist, da die ATII-Zellen u.a. als Stammzellen der ATI-Zellen fungieren (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Durch den unter hyperoxischen Bedingungen vermehrt aktiven TGF- β /SMAD-Signalweg und den Nachweis von größerer Empfindlichkeit der ATII-Zellen, auf den antiproliferativen, teils sogar proapoptotischen Effekt von TGF- β , bei Hyperoxie, kann eine Übertragbarkeit zur BPD vermutet werden. Es kommt hier zu vergleichbaren Störungen der Alveolarstruktur (Alejandre-Alcázar 2007). Auch Fibroblasten zeigen unter solchen Gegebenheiten eine größere Empfindlichkeit auf dieses Zytokin, was in ihrem Falle zu einer gesteigerten Produktion von Extrazellulärmatrix (EZM)-Proteinen führt. Ein bedeutsamer Mechanismus dahinter könnte die Differenzierung von Fibroblasten zu speziellen Myofibroblasten sein, welche - wie zuvor in 1.1 beschrieben - bindewebsassoziierte Strukturproteine, wie TROPOELASTIN und KOLLAGEN, synthetisieren (Zhang, Gharaee-Kermani et al. 1996, Bourbon, Boucherat et al. 2005). Ein Überfluss hiervon mündet in der Fibrose. Neben der bereits erwähnten Wirkung von Sauerstoff auf den TGF- β -Signalweg, findet man auch eine Produktion von inflammatorischen, profibrotischen Zytokinen, wie TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), TGF- β und anderen, in Zusammenhang mit einer Überblähung der Lunge aufgrund von Beatmung (Gauldie, Galt et al. 2003). Es besteht also eine Kausalität zwischen diesem Signalweg und den wichtigsten Risikofaktoren für eine BPD: Hyperoxie, Beatmung und Inflammation.

1.6 Epithelial-Mesenchymale Transition

Einen weiteren möglichen Effekt, an dem die TGF- β -Signaltransduktion beteiligt sein kann, stellt die Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) dar. Bei der EMT erlangen ursprünglich epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften (Borthwick, Parker et al. 2009), vergleichbar mit einer Zelldifferenzierung. Epithelien sind für gewöhnlich durch Zelladhäsionen wie Desmosomen oder *tight junctions* eng verbundene Zellverbände, die durch Polarität spezielle Aufgaben übernehmen können. Unter bestimmten Bedingungen ändern sie nun also ihre Morphologie in eine fibroblastenartige Spindelzellform, exprimieren andere Proteine und können sich auch unabhängig vom Zellkomplex bewegen (Lee, Dedhar et al. 2006). Zunächst einmal ist EMT ein physiologischer Vorgang, z.B. in der Embryologie wird so die Invasion von Trophoblastzellen in die Uterusschleimhaut (Vicovac and Aplin 1996) oder die Migration von Zellen der Neuralleiste möglich (Newgreen and McKeown 2005). In den Ovarien wurde EMT in Zusammenhang mit der normalen Wundheilung des Oberflächenepithels nach der Ovulation untersucht (Woolery and Kruk 2011). Eine Art eskalierender Wundhei-

1 Einleitung

lungsprozess, oft als Antwort auf eine chronische Entzündung, stellt die Fibrose unterschiedlicher Organe dar. Mittels EMT werden hier diverse Fibroblasten bereitgestellt, welche die massive Produktion von extrazellulärer Matrix realisieren (Iwano, Plieth et al. 2002). Auf eine ebenfalls pathologische Variante der EMT, trifft man in epithelialen Tumorarten, wie beispielsweise dem Mammakarzinom, Haut- oder Blasentumoren. An dieser Stelle führt die veränderte Biochemie der Zellen zur Metastasierung (Lee, Dedhar et al. 2006). Diese verschiedenen EMT-Sorten kann man, aus Gründen der Übersichtlichkeit und ihrer leicht unterschiedlichen Mechanismen, in 3 Gruppen klassifizieren. Typ 1 ist assoziiert mit Entwicklung, Typ 2 mit Regenerationsprozessen - physio- oder pathologischen Ursprungs - und die neoplasie-assoziierte Sorte bildet Typ 3 (Kalluri and Weinberg 2009).

Wie wird diese Umwandlung nun induziert? Als Trigger für EMT sind u.a. die Signalwege von TGF- β , TNF- α , HGF (*hepatocyte growth factor*) sowie ZEB1 (*transcriptional repressor zinc-finger E-box binding homeobox1*) bekannt (Burk 2008). Für diese Arbeit entscheidend ist der Weg über TGF- β , welcher durch epithelialen Stress, wie beispielsweise Entzündung oder Verletzungen ausgelöst werden kann (Iwano, Plieth et al. 2002, Hay 2005). Inflammatorische Zellen, z.B. Makrophagen, sezernieren TGF- β (Khalil, Berezney et al. 1989). Zusätzliche Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) führt zunächst zum Abbau der Basalmembran, sozusagen der Verankerung der Epithelien (Strutz, Zeisberg et al. 2002), wodurch die enthafteten Zellen, angelockt durch Chemokine, in das Interstitium abwandern (Kalluri and Weinberg 2009). Ermöglicht wird die Migration durch aktiviertes SMAD3 (klassischer TGF- β -Signalweg), das im Komplex mit SMAD4 direkt die Synthese des Kernfaktors LEF-1 (lymphoid enhancer factor-1) bewirkt (Medici, Hay et al. 2006). Durch die Interaktion von T β R-I mit einer Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird im Folgenden die Glycogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) phosphoryliert und somit deaktiviert (Yi, Shin et al. 2005). Die Degradation von β -CATENIN und dem Transkriptionsfaktor SNAIL wird hierdurch beeinträchtigt. β -CATENIN, das sich nun im Zytoplasma anreichert, und LEF-1 können sich erstens gegenseitig regulieren und stabilisieren, zweitens besitzen sie die Fähigkeit die Transkription von E-CADHERIN (*Ca²⁺ adhering* – Calcium-abhängige Verbindung) zu mindern (Kim, Lu et al. 2002, Medici, Hay et al. 2006). E-CADHERIN ist ein wichtiger Bestandteil von v.a. epithelialen Adhäsivkontakten. Weiterhin wurde entdeckt, dass ILK (*integrin-linked kinase*), die auch flussabwärts des TGF- β Signalweges zu finden ist, E-CADHERIN auf noch nicht sicher bekannte Weise reprimiert. Eine Idee hierzu ist die Zwischenschaltung von SNAIL (Li, Yang et al. 2003). Das Zinkfingerprotein SNAIL, auf dem *SNAI1*-Gen gelagert, wie auch der zur selben Familie gehörende Faktor SLUG, wird nicht nur durch den klassischen TGF- β -Weg aktiviert bzw. sein Abbau verhindert, sondern auch in Folge der Aktivierung von MAP-Kinase durch TGF- β stärker exprimiert. Sein Eingreifen in die Transkriptionsprozesse lässt ebenfalls

1 Einleitung

die Biosynthese der, an Zellkontakten beteiligten, Proteine E-CADHERIN, OCCLUDIN und CLAUDIN abebben (Medici, Hay et al. 2006). Dies ist nur ein Beispiel dafür, wie viele Signalwege bei dem Vorgang der Epithelial-Mesenchymalen Transition ineinandergreifen (Zhang 2009, Gui, Sun et al. 2012). Selbst innerhalb des TGF- β -Signalweges findet ein *cross-talk* zwischen den Pfaden der drei Liganden (TGF- β 1/2/3) statt. Beispielsweise induziert der durch TGF- β 1 stimulierte Faktor SNAIL, indirekt über β -CATENIN-Komplexe, den TGF- β 3-Liganden, der wiederum die Expression des zuvor erwähnten Kernfaktors LEF-1 steigert (Medici, Hay et al. 2008). Zusätzlich unterstützt auch ILK die Transition durch Antreiben der FIBRONECTIN-Transkription und der Verstauung von FIBRONECTIN in der extrazellulären Matrix (Li, Yang et al. 2003). Ein weiteres Protein, in der Vernetzung zwischen TGF β R-Aktivierung und der resultierenden EMT, ist der Kernfaktor HMGA2 (*high mobility group A2*). Seine eigene Expression wird durch TGF- β stimuliert, sodass er darauffolgend als Verstärker desselben wirken kann, indem er in AT-reichen Regionen die DNA bindet und hierdurch andere Transkriptionsfaktoren reguliert. Neben den oben angeführten, SNAIL und SLUG, außerdem den helix-loop-helix Transkriptionsfaktor TWIST (Thuault 2006). So erwerben die betroffenen Zellen mesenchymale Marker, beispielsweise N-CADHERIN, was im Gegensatz zu seinem Verwandten E-CADHERIN, typisch für Fibroblasten ist und einen beweglicheren Phänotyp fördert, indem es Adhäsionen mit der EZM formt und die Zellen veranlasst Filopodien auszubilden (Derycke and Bracke 2004). Auch die beiden zytoskelett-assoziierten Marker FSP1 (Fibroblasten spezifisches Protein 1) und VIMENTIN, werden durch TWIST forciert (Pozharskaya 2009). Durch den Nachweis von α -SMA (α -smooth muscle actin) erkennbar, entstehen spezialisierte Fibroblasten - die bereits mehrfach beschriebenen Myofibroblasten - welche kontraktile Eigenschaften besitzen. In der Lunge sind sie physiologisch während der Sprossung der Sekundärsepten von Bedeutung (Yamada 2005), aber bei übermäßigem Vorkommen oder falscher Lokalisierung haben sie an der Entstehung fibrotischer Bereiche teil (Zhang, Gharaee-Kermani et al. 1996, Li, Yuan et al. 2012). Nicht nur die veränderte Zahl an Bindegewebszellen, sondern auch die fehlenden epithelialen Zellen fallen hier ins Gewicht, da sie z.B. durch Zellinteraktionen die Migration der Myofibroblasten zum richtigen Ort steuern und später für die Blut-Luft-Schranke oder die Surfactantbildung zuständig sind (Bourbon, Boucherat et al. 2005, Li, Yuan et al. 2012). Fehlregulierung von Myofibroblasten wurde zuvor schon mit der BPD in Zusammenhang gebracht (Bland 2005).

Interessant für das weitere Verständnis und eventuelle Interventionsmöglichkeiten in diesem Prozess der EMT ist, dass er im Fortschreiten gehindert werden kann bzw. reversibel ist. Der Vorgang wird dann konträr als Mesenchymal-Epitheliale Transition bezeichnet. Untersuchungen hierzu zeigten die Möglichkeit, durch BMP-7 die TGF- β -induzierte EMT umzukeh-

1 Einleitung

ren (Zeisberg, Hanai et al. 2003) oder ihr durch I-SMAD7 (Über-)Expression vorzubeugen (Willis and Borok 2007).

1.7 Die Rolle der microRNAs

Lee et al. entdeckten 1993 in dem Nematoden *C. elegans* das eine kleine RNA (22 Nukleotide), das Genprodukt von *lin-4*, nicht weiter translatiert wird, sondern als solche regulatorische Aufgaben übernimmt (Lee 1993). So tauchte das immer mehr in den Fokus rückende Forschungsgebiet der microRNAs auf, was nicht nur in der Physiologie, sondern auch für das Verständnis der Pathologie Fortschritte mit sich brachte. Wie etwa bei der idiopathischen pulmonalen Fibrose, wo microRNA-21 den Zytokinsignalweg von TGF- β moduliert. Durch seine Aktivierung wird zunächst die Expression der microRNA-21 gesteigert und diese führt im Verlauf, durch Hemmung von I-SMAD7, wiederum zur Enthemmung der hier profibrotisch wirkenden Signaltransduktion (Liu, Friggeri et al. 2010).

Die Transkription erfolgt hauptsächlich durch die Polymerase II, doch nachrangig auch durch die üblicherweise für noch kleinere Genprodukte zuständige Polymerase III (Bartel 2004, Lee, Kim et al. 2004). Das Primärtranskript, was um 1000 Nukleotide (nt) lang ist, bildet eine Schleife und wird nun pri-microRNA genannt (Lee 2002, Bartel 2004). Es besitzt, wie andere Transkripte, den Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und die 7-Methylguanosin-Kappe am 5'-Ende (Cai, Hagedorn et al. 2004). Ungefähr 10 Nukleotide oberhalb der Basis der Schleifenstruktur wird die RNA nun durch eine Endoribonuklease III - die sogenannte Drosha - so gekürzt, dass eine ca. aus 70 nt bestehende Haarnadelform (*hairpin*) mit einem 3'-Überhang und einem 5'-Phosphat resultiert (Kim 2005). Nur Schleifen mit einer bestimmten Konfiguration werden geschnitten. Entscheidend ist eine mindestens 10 nt lange terminale Schlaufe in einer Entfernung von ~2 Helices zu der zu schneidenden Stelle (Zeng, Yi et al. 2005). Hierfür bildet Drosha mit einem Cofaktor, dem *Di George syndrome critical region gene 8* (DGCR8), der auch eine RNA bindende Domäne besitzt und so die Substratanlagerung unterstützt, einen ca. 650 kDa schweren Mikroprozessorkomplex (Denli, Tops et al. 2004, Han, Lee et al. 2004). Aufgrund seiner Funktion als „Vorläufer“ (*precursor*), wird das Produkt nun als pre-microRNA bezeichnet. Nun findet aktiv, unter Zuhilfenahme von Ran-GTP, ein Ortswechsel vom Nucleus durch Exportin-5 zum Zytoplasma statt (Bohnsack, Czapinski et al. 2004). Diese Interaktion mit der Kernpore führt darüber hinaus zu einer Stabilisierung der RNA (Yi, Qin et al. 2003).

Die weitere Prozessierung erfolgt durch das Enzym Dicer, wiederum eine Endonuklease. Im Menschen wirkt nun *HIV-1 TAR RNA binding protein* (TRBP) als Cofaktor (Chendrimada, Gregory et al. 2005). Nach Abtrennen der zuvor beschriebenen Schlaufe entsteht schließlich

1 Einleitung

eine - noch doppelsträngige - ca. 22 nt lange RNA, die im Folgenden durch eine Helikase in Einzelstränge getrennt wird. Der Strang mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende fungiert meist als reife microRNA, wohingegen der komplementäre Gegenstrang, der in der Nomenklatur mit einem Stern (microRNA*) versehen wird, wohl nur selten regulatorische Fähigkeiten besitzt (Schwarz, Hutvagner et al. 2003, Bartel 2004, He 2004). Er wird dem Abbau zugeführt. Im Anschluss entsteht der Effektor-Komplex aus der reifen microRNA und Argonautenproteinen (v.a. AGO2 im Menschen) - selbst stark konservierte Proteine - welche eine Endonukleaseaktivität besitzen (Liu, Carmell et al. 2004, Meister, Landthaler et al. 2004). In Annotation zur RNA-Interferenz mittels siRNA enthaltenden Komplexen, wie *siRISC* oder *siRNA*, wird der Effektor-Komplex hier *mirgonaute*, *miRISC* (*microRNA-containing RNA-induced silencing complex*) oder auch *miRNP* (*microRNA-containing ribonucleoprotein complex*) genannt (Kim 2005).

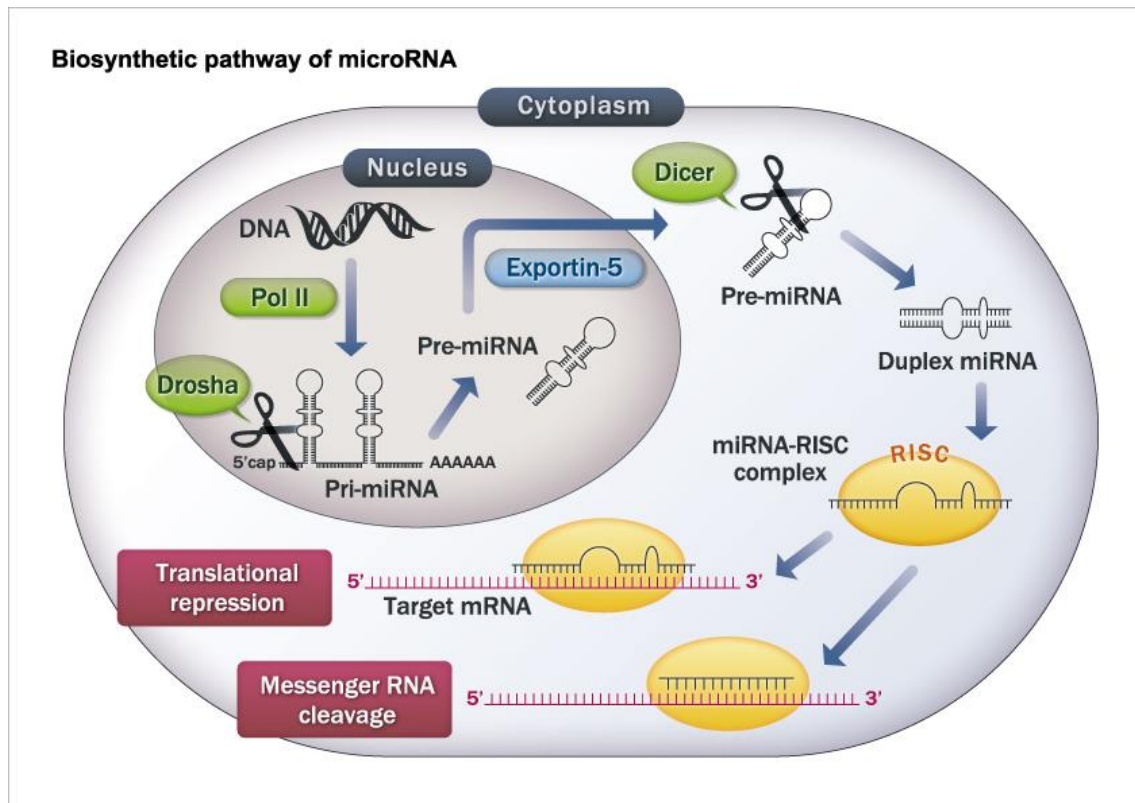


Abbildung 5 MicroRNA-Synthese

Durch Polymerase II transkribierte Pri-microRNA wird an der Basis von speziellen Schleifenstrukturen durch Drosha geschnitten. Die so entstandene Pre-microRNA wird durch die Endonuklease Dicer prozessiert, nachdem sie mit Hilfe von Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert wurde. Der eine - biologisch aktive - Strang, der zunächst doppelsträngigen microRNA, bildet mit Argonautproteinen den Effektor-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*). Je nach Komplementarität werden Ziel-mRNAs durch diesen direkt zerlegt (*messenger RNA cleavage*) oder ihre Translation gestoppt und dem regulären Abbau verfrüht zugeführt (genomejet.jp) (14.8.15). "http://genomejet.jp/english/wp-content/uploads/2011/11/rna_1en1.jpg".

Die Gene für microRNAs können sowohl in Exons, als auch in Introns sogenannter *host-genes* (Gastgeber-Gene) liegen (Bartel 2004). Desweiteren kommen ca. 50% der microRNA-Gene in *Clustern* (engl. Bündel, Gruppen) vor, wie z.B. die microRNA-15a/microRNA-16-Familie auf Chromosom 13 (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2002, Lee 2002, Bartel 2004). In beiden Fällen - *host-genes* und *Clustern* - wird teilweise eine funktionelle Coexpression angenommen (Lau 2001 Baskerville 2005, Rodriguez, Griffiths-Jones et al. 2004). Das Vorkommen mancher microRNAs ist gewebespezifisch, andere sind ubiquitär zu finden (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2002, Lim, Lau et al. 2003). Durch Sequenzierung oder neuerdings mit Hilfe von algorithmischen Berechnungen (Chen 2007), konnten in den Jahren immer neue microRNAs identifiziert werden. Etwa 2-3% des gesamten menschlichen Genoms bestehen aus microRNA-Genen. Man findet sie auf allen Chromosomen, abgesehen vom Y-Chromosom (Kim 2006). Eine gemeinsame, definierende Eigenschaft sind die über Spezies hinweg hochkonservierten Sequenzen oder zumindest orthologe Gene bei weiter entfernten Arten (Wienholds 2005). Diese Konservierung beo-

1 Einleitung

bachtet man vor allem im 5'-Bereich der reifen microRNA, welcher die *seed-sequence* (Keim-Sequenz) beinhaltet (Kim 2006). Diese ist ausschlaggebend für die Bindung mit der *target-messenger-RNA* (target-mRNA), also der zu regulierenden Ziel-mRNA. Sie besteht aus 6-8 Nukleotiden beginnend an Position 2 (Kim 2006). Abhängig von der Komplementarität, zwischen microRNA und der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der target-mRNA, kommt es nun auf verschiedene Art und Weise zum *gene silencing* (Genstilllegung). Bei vollständiger Komplementarität wird die mRNA spezifisch, zwischen den Nukleotiden die an Position 10 und 11 der microRNA gebunden sind, zerschnitten (Hutvagner and Zamore 2002). Da die RNAs in Pflanzen häufig höhergradig komplementär sind, ist dies dort der vorherrschende Mechanismus (He 2004). Im Falle von unvollständiger Komplementarität wurde früher angenommen, dass eher die Translation selbst unterdrückt wird. Entweder durch Hemmung der Ribosomen oder durch sofortigen Abbau des entstandenen Polypeptides (Olsen and Ambros 1999). Laut neuerer Erkenntnisse, erfolgt eine Destabilisierung der mRNA, durch Deadenylierung, was wiederum zum *de-capping* und so zur beschleunigten, jedoch regulär ablaufenden, Degradation der mRNA führt. Ebenfalls wird auf solche Weise eine wiederholte Translation der selben mRNA verhindert (Guo, Ingolia et al. 2010).

Häufig gesteuerte Bereiche sind Wachstum, Teilung und Differenzierung, welche Elemente bedeutender Felder wie embryonaler Entwicklung und Krebsentstehung sind (Kim 2005, Wienholds 2005).

2 Hypothesen und Ziele

Ziel dieser Dissertation war es, weiteres Detailwissen über zwei in der Lungenentwicklung und demzufolge im Pathomechanismus der Bronchopulmonalen Dysplasie gewichtigen Signalwege, dem von RA und dem von TGF- β , zu erlangen. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass die BPD noch immer eine sehr häufige Komplikation extremer Frühgeburtlichkeit darstellt, welche teilweise lebenslange Folgen für die Lungenfunktion mit sich bringt. Es ist wünschenswert durch solche Untersuchungen auf lange Sicht effektive Prophylaxe- und Therapiekonzepte erstellen zu können.

Gearbeitet wurde mit dem in diesem Forschungsbereich etablierten Mausmodell der BPD, sowie verschiedenen Zellreihen, welche die Eigenschaften des Lungengewebes ausreichend widerspiegeln. Die erstellten Hypothesen lauten:

1. MicroRNAs beeinflussen die Translation des *retinoic acid receptor- β* und können somit indirekt die Effekte des Retinsäure-Liganden modulieren.
2. MicroRNAs aktivieren den TGF- β -Signalweg, indem sie, durch gezielte Veränderung der Genexpression oder beschleunigten Abbau von SMURF2, dessen Inhibition einschränken.
3. Infolge der Enthemmung des TGF- β Signals durch Eingreifen von microRNAs, kommt es in Lungenepithelien zu EMT-ähnlichen Veränderungen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav	Systec, Deutschland
Biosphere® Filter tips (0,5 – 1000µl)	Sarstedt, Deutschland
CellScraper 25cm	Sarstedt, Deutschland
Cellstar® Zellkulturflaschen (250ml)	Greiner Bio-One, Deutschland
Falcon® Serologische Pipetten (5, 10, 20 ml)	VWR, USA
Schraubröhre (15, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland
HERAcell™ 150i	Thermo Scientific, Deutschland
Heraeus® Multifuge 3S-R	Thermo Scientific, Deutschland
HLC Vakuumabsaugsystem	Ditabis, Deutschland
ImageQuant Las 4000	GE Health Care, Deutschland
InoLab® pH-Messer	WTW, Deutschland
Kühlfähige Minizentrifuge CT15RE	VWR, USA
Laminar Flow Werkbank	Thermo Scientific, USA
Magnetic Stirrer	VWR, USA
Merck® eurolab Vortex-Mixer	VWR, USA
MicroAmp® FAST 96-well Platten	Applied Biosystems, USA
Mikroskop DM IL	Leica, Deutschland
Millex® GP Filter Unit 0,22µm	Merck Millipore, USA
Mini Protean® Tetra cell	Bio-Rad, USA
Mini Spin	Eppendorf, Deutschland
Mini Trans-Blot® cell	Bio-Rad, USA
NanoDrop® ND 1000	Peqlab, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad, USA
peqStar (PCR-Maschine)	Peqlab, Deutschland
Pipetten (2,5 – 1000µl)	Eppendorf, Deutschland
Pipetboy	Eppendorf, Deutschland
Power Pac 3000	Bio Rad, USA
Precellys® 24 Homogenisator	Peqlab, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR	Applied Biosystem, USA

3 Material und Methoden

ThermoShaker	Universal Labortechnik, Deutschland
Transwell® Permeable supports	Costar, USA
VersaMax ELISA Mikroplattenleser	Molecular Devices, USA
Wärmebad E100	Lauda, Deutschland
Zellkultur-Platten (6-; 96- well)	Greiner Bio-One, Deutschland

3.1.2 Reagenzien

Acrylamid-Lösung, Rotiphoress Gel 30	Roth, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Promega, USA
ATRA	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bromphenol blau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deutschland
Complete™ Proteaseinhibitor	Roche, Deutschland
DMEM (1x)+GlutaMAX™-I	Gibco® life science, USA
DMEM/F12(1x)+GlutaMAX™-I	Gibco® life science, USA
DTT	Promega, USA
Dulbecco's phosphate buffered saline (10x,1x)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethanol (99,9% ; 70%)	Roth, Deutschland
Ethylendinitrilo-N,N,N',N'-tetra-acetic-acid (EDTA)	Promega, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Lonza, Schweiz
Glycerol	Merck, Deutschland
Glycin	Roth, Deutschland
HiPerFect Transfection Reagent	Qiagen, Deutschland
HyClone™ Penicillin-Streptomycin 100X	GE Healthcare, Österreich
Methanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
MgCl ₂ 50mM	Invitrogen, USA
MgCl ₂ 25mM	A&B, USA
Milchpulver	Roth, Deutschland
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
miScript II RT-Kit	Qiagen, Deutschland
miScript SYBR®Green PCR Kit	Qiagen, Deutschland
MuLV reverse Transkriptase	Applied Biosystem, USA
Natrium-orthovanadat	Sigma-Aldrich, Deutschland
N,N,N',N'-tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED)	Bio-Rad, USA
Nuklease freies Wasser	Ambion, USA
Oligo(dT)primer	Promega, USA

3 Material und Methoden

Opti-MEM® Medium	Gibco® life science, USA
PCR Buffer II 10x	A&B, USA
PCR Nucleotide Mix	Promega, USA
Platinum®SYBR Green qPCR Supermix-UGD	Invitrogen, USA
Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad, USA
2-Propanol	Merck, Deutschland
Quick Start™ Bradford Dye	Bio-Rad, USA
Random Hexamers	Applied Biosystems, USA
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, USA
SDS 10% Lösung	Promega, USA
SuperSignal®WestFemto Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Scientific, USA
TE Buffer	Invitrogen, USA
Tris	Roth, Deutschland
Trypsin/EDTA	Gibco® life science, USA
TurboFect	Thermo Scientific, USA
Tween®20	Sigma-Aldrich, Deutschland

3.1.3 Zellkulturen

Zellreihen:

NIH/3T3	Invitrogen, USA
A549	ATCC, Großbritannien

3.1.4 Primer

Tabelle 1 Primer für *real time-RT-PCR* (microRNA)

Name	Hersteller	Bestellnummer
miScript Primer Assay Mm-miR-322	Qiagen, Deutschland	MSY0000548
miScript Primer Assay Mm-miR-497-1	Qiagen, Deutschland	MS00002569
miScript Primer Assay Hs-miR-497-1	Qiagen, Deutschland	MS00004361
miScript Primer Assay Hs-RNU6-2_11	Qiagen, Deutschland	MS00033740

3 Material und Methoden

Tabelle 2 Primer für *real time-RT-PCR* (mRNA)

Name	Basensequenz (vorwärts)	Basensequenz (rückwärts)	Art
<i>RARB</i>	5'- TCCGAAAAGCTCACCAGG AAA-3'	3'- GGCCAGTTCACCTGAATTTG TCC-5'	Mensch
<i>Rarb</i>	5'- AAGGGCTTTTTCCGCAGA AGT-3'	3'- GCATCGGTTCCCTAGTGAC CT-5'	Maus
<i>E-CADHERIN</i>	5'- AAAGGCCCATTTCTCTAAA AACCT-3'	3'- TGCGTTCTCTATCCAGAGG CT-5'	Mensch
<i>N-CADHERIN</i>	5'- TCAGGCGTCTGTAGAGGC TT-3'	3'- ATGCACATCCTTCGATAAG ACTG-5'	Mensch
<i>ACTA2</i>	5'- AAAAGACAGCTACGTGGG TGA-3'	3'- GCCATGTTCTATCGGGTAC TTC-5'	Mensch
<i>Acta2</i>	5'- ACTCTCTTCCAGCCATCT TTC-3'	3'- ATAGGTGGTTTCGTGGAT GC-5'	Maus
<i>E-Cadherin</i>	5'- GTGTTGACGTCATCGTCT GC-3'	3'- GTTGCAGAAGGCGCTGTT- 5'	Maus
<i>Smurf2</i>	5'- AAACAGTTGCTTGGAAG TCA-3'	3'- TGCTCAACACAGAAGGTAT GGT-5'	Maus
<i>SNAIL</i>	5'- GCTGCAGGACTCTAATCC AGAGTT-3'	3'- GACAGAGTCCCAGATGAG CATTG-5'	Mensch
<i>SMAD2</i>	5'- CGTCCATCTTGCCATTCA CG-3'	3'- CTCAAGCTCATCTAATCGT CCTG-5'	Mensch
<i>SMAD3</i>	5'- TGGACGCAGGTTCTCCAA AC-3'	3'- CCGGCTCGCAGTAGGTAA C-5'	Mensch

3 Material und Methoden

<i>SMURF2</i>	5'- GGCAATGCCATTCTACAG ATACT-3'	3'- CAACCGAGAAATCCAGCA CCT-5'	Mensch
<i>N-Cadherin</i>	5'- AGCGCAGTCTTACCGAAG G-3'	3'- TCGCTGCTTTCATACTGAA CTTT-5'	Maus
<i>PAI-1</i>	5'- ACCGCAACGTGGTTTTCT CA-3'	3'- TTGAATCCCATAGCTGCTT GAAT-5'	Mensch
<i>Hprt1</i>	5'- GCTGACCTGCTGGATTAC -3'	3'- TTGGGGCTGTACTGCTTA- 5'	Maus
<i>GAPDH</i>	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAG TC-3'	3'- GGAGATGGTGATGGGATT TC-5'	Mensch
<i>Polr2a</i>	5'- CTAAGGGGCAGCCAAAG AAAC-3'	3'- CGGATCTCAACATACGACT TACC-5'	Maus

3.1.5 Antikörper

Tabelle 3 Verwendete Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Retinoic acid recep- tor β Rabbit antibody	1:1000	abcam, Großbritannien	Ab53161
Anti- β -ACTIN Rabbit antibody	1:1000	Cell Signaling, USA	#4967L
Anti-phospho-SMAD2 Rabbit antibody	1:1000	Cell Signaling, USA	#3101S
Anti-total-SMAD2/3 Rabbit antibody	1:1000	Cell Signaling, USA	#3102S
Anti-total-SMAD3 Rabbit antibody	1:1000	Cell Signaling, USA	#9523S
Anti-SMURF2 Rabbit antibody	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA	#B0304

3 Material und Methoden

Anti- α -SMA Mouse antibody	1:1000	Sigma-Aldrich, Deutschland	A5228
Anti-TGF- β receptor I Rabbit antibody	1:1000	Cell Signaling, USA	#3712

3.1.6 microRNA-mimics

Tabelle 4 Zur Transfektion verwendete microRNA-mimics

Name	Hersteller	Catalog Number
miScript miRNA Mimic Syn-mmu-miR-322-5p	Qiagen, Deutschland	MSY0000548
miScript miRNA Mimic Syn-hsa-miR-424-5p	Qiagen, Deutschland	MS00004186
miScript miRNA Mimic Syn-mmu-miR-497-5p	Qiagen, Deutschland	MSY0003453
miScript miRNA Mimic Syn-hsa-miR-497-5p	Qiagen, Deutschland	MSY0002820
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Deutschland	SI03650318

3.2 Methoden

Für Untersuchungen an Zellreihen wurden technische Triplikate hergestellt, bei solchen an Primärzellen und Lungenhomogenaten des BPD-Modells wurden biologische Replikate verwendet und nochmals technische Replikate erstellt.

3.2.1 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Zelllinien NIH/3T3 und A549; Primäre pulmonale Mausfibroblasten

Alle 3 - 4 Tage wurden konfluent, adhären am Boden der Zellkulturflasche gewachsene Zellen passagiert, indem zunächst nach Absaugen des alten Mediums mit 5 Millilitern (ml) PBS (*phosphate buffered saline*) gespült wurde und anschließend die Flasche drei Minuten bei 37 °C mit 3 ml Trypsin inkubiert wurde. Nach Ablösen der Zellen, wurden diese in eine neue Zellkulturflasche mit Vollmedium gegeben und wieder bei 37 °C in den Brutschrank gestellt.

Zur Wahl des Mediums wurden Herstellerangaben der Zelllinien oder Primärzellen befolgt. Das Medium wurde mit 10% FBS (*fetal bovine serum*) versetzt und Penicillin-Streptomycin-Lösung zum Schutz vor einer Kontamination zugegeben.

3.2.2 Transfektion von Zelllinien und Primärzellen mit microRNA-mimics

Zelllinien NIH/3T3 und A549; Primäre pulmonale Mausfibroblasten

Die Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert. Je 1 ml Opti-MEM Medium und 4 µl TurboFect wurden mit 40 nM der entsprechenden microRNA (negativ Kontrollen mit unspezifischen microRNAs) 20 Minuten bei Zimmertemperatur vorinkubiert. Nach dem Absaugen des Vollmediums, wurde die vorinkubierte Mischung in jede Vertiefung getropft.

Nach 3 - 4 Stunden Inkubation bei 37 °C, wurde 1 ml Vollmedium zugefügt, woraus sich eine microRNA Konzentration von 50 nM/well ergab. Weitere 24 oder 48 Stunden wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert.

Alveolar Epithelzellen Typ II

Nach der Isolation aus der Mauslunge wurden die ATII-Zellen 4 Tage in 6-well-Platten inkubiert, bis sie ausreichend konfluent waren. Nun wurden sie mit einer Mischung aus 1 ml DMEM, 10 µl Hiperfect und ebenfalls 10 µl microRNA mimic oder *control* (Scr) mimic transfektiert. Außerhalb der Membran wurden noch 2 ml DMEM hinzugefügt. Durch Absaugen der Medien, beliebig nach 48 oder 72 Stunden Inkubation, wurde die Transfektion beendet.

3.2.3 Zellstimulation

ATRA

Einige Zellen wurden, zusätzlich zur Transfektion, ebenfalls für 24 Stunden mit ATRA stimuliert. Hierfür wurde die Inkubation der Zellpopulationen mit einer ATRA-Lösung der Stoffmengenkonzentration 10 µmol/l vorgenommen.

TGF-β

Nach der Transfektion für 24 bzw. 48 Stunden mit microRNA-mimics, wurden die Zellen in manchen Versuchsreihen für 10 oder 30 Minuten mit einer TGF-β-Lösung der Konzentration 5 ng/ml inkubiert. Durch eine solche Stimulation wird die entsprechende Genexpression insgesamt angekurbelt, wodurch auch eine quantitativ geringe Veränderung auf mRNA- oder Proteinebene, sonst nur wenig exprimierter Gene, deutlicher sichtbar wird.

In anderen Versuchsreihen wurden Zellen, ohne vorherige Transfektion, ausschließlich für 24 Stunden mit TGF-β-Lösung (5 ng/ml) stimuliert.

3.2.4 RNA Isolation

Die RNA Isolation erfolgte, nach Absaugen des Mediums aus den 6-well-Platten, mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits wie im Protokoll des Herstellers Qiagen beschrieben.

Zum Messen der Konzentration wurden die Proben der extrahierten RNA mit einem Nanodrop Spektrophotometer untersucht.

3.2.5 Reverse Transkription

3.2.5.1 cDNA Herstellung (microRNA)

Es wurde 1 µg RNA mit den Reagenzien des miScript II RT-kits vermischt und das Volumen mit Nuklease freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

<u>Reagenzien:</u>	Hispec Puffer	4 µl
	Nucleic Mix	2 µl
	Reverse Transkriptase	2 µl

Nun wurden folgende Schritte durch die PCR-Maschine pegStar ausgeführt:

37 °C 1 Stunde

95 °C 5 Minuten

3.2.5.2 cDNA Herstellung (mRNA)

Auch hier wurde 1 µg RNA verwendet, Nuklease freies Wasser zugegeben bis 20 µl des Gemischs vorlagen und nun die RNA bei 70 °C 10 Minuten denaturiert.

Anschließend wurden entsprechende Mengen der Reagenzien hinzugefügt:

25 mM MgCl ₂	8 µl
10x PCR Puffer II	4 µl
10 nM dNTP-Mix	2 µl
Random hexamers	2 µl
MuLV Reverse Transkriptase	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
dH ₂ O	1 µl

3 Material und Methoden

Das gewählte Programm des peqStar beinhaltet:

21 °C	10 Minuten
43 °C	1 Stunde 15 Minuten
99 °C	5 Minuten

3.2.6 Real time-RT-PCR

3.2.6.1 microRNA real time-RT-PCR

Je 2,5 µl jeder cDNA wurden mit den Reagenzien aus dem miScript SYBR®Green PCR Kit und 2,5 µl des speziellen Primers, je nach gefragter microRNA, in eine 96-well-Platte pipettiert. Als Kontrolle wurden Primer für small nuclear RNA (snRNA = Hs-RNU6-2_11) verwendet.

miScript SYBR®Green PCR Kit:

SYBR®Green	12,5 µl
dH ₂ O	5 µl
Universalprimer	2,5 µl

StepOnePlus PCR:

50 °C	2 Minuten	
95 °C	5 Minuten	
95 °C	5 Sekunden	} 40 Zyklen
59 °C	5 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
95 °C	15 Sekunden	
60 °C	1 Minute	
95 °C	15 Sekunden	
60 °C	15 Sekunden	

3.2.6.2 mRNA *real time-RT-PCR*

Hier wurden 2 µl cDNA mit 1 µl Primer für das jeweilige Genprodukt mit weiteren Reagenzien vermischt:

Master Mix	13 µl
dH ₂ O	8 µl
MgCl ₂	1 µl

Haushaltsgen für die Zellreihe NIH/3T3 und Primärzellen war *Hprt1*, für die Zellreihe A549 war *GAPDH* sowie *Polr2a* für Zellen aus Mäuselungen die Normoxie und Hyperoxie ausgesetzt waren.

StepOnePlus PCR:

95 °C	10 Minuten	}	40 Zyklen
95 °C	15 Sekunden		
60 °C	1 Minute		
95 °C	15 Sekunden		
60 °C	1 Minute		
95 °C	15 Sekunden		

3.2.7 Protein Isolation

3.2.7.1 Zellen

Zu 1 ml des vorbereiteten Lysierungspuffers wurden 40 µl Complete und 10 µl Natriumorthovanadat zur Hemmung der Proteasen hinzugegeben.

Lysierungspuffer: 20 mM Tris (pH 7,5)

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

0,5% NP-40

3 Material und Methoden

Nach Zugabe von 100 µl der Mixtur in jede Vertiefung der 6-well-Platte und Ablösen der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers, wurden diese in Eppendorfgefäßen für 45 Minuten auf Eis inkubiert und alle 10 Minuten gut durchmischt.

Der Überstand nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm (*revolutions per minute*) und 4 °C, wurde nun als Probe für Western Blots verwandt.

3.2.7.2 Gewebe

Um Proteine aus Lungengewebe zu isolieren, wurde dieses zunächst wie vom Hersteller PeqLab vorgegeben in einem Precellys Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurde, wie oben bei der Proteinisolation aus Zellen beschrieben, weiter vorgegangen.

3.2.7.3 Bradford Analyse zur Proteinkonzentration

Es wurden Verdünnungen aus jeder Probe und auch aus dem Lysierungspuffer hergestellt, im Verhältnis 1:10 bei zellulärem Ursprung und 1:50 wenn mit Gewebe gearbeitet wurde. Ebenso wurde mit verschiedenen konzentrierten Lösungen (0,05 µg/µl - 0,1 µg/µl - 0,2 µg/µl - 0,3 µg/µl - 0,4 µg/µl - 0,5 µg/µl) einer Proteinstandardreihe aus Rinderserum verfahren.

Nun wurden Duplikate jeder Verdünnung auf einer 96-well-Platte verteilt und mit je 200 µl QuickStart™ Bradford Farbstoff 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkonzentrationen wurden, nach Auslesen mit dem VersaMax Microplattenleser bei 590 nm, anhand der Standardreihe berechnet.

3.2.8 Sodium dodecyl sulfate (SDS)-Elektrophorese und western blot

3.2.8.1 Gelherstellung

Zunächst wurde ein 10%iges Trenngel gegossen, welches nach Verfestigung mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet wurde. Dieses hat, auf Grund großer Poren, noch keinen Siebeffekt, allerdings konzentriert es die Protein-Puffergemische in einer Ebene. Im folgenden engporigen Trenngel können die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

<u>Trenngel:</u>	dH ₂ O	7,95 ml	
	30% Acrylamid	6,65 ml	
	1,5 M Tris - HCl (pH 8,8)	5 ml	
	10% Sodiumdodecylsulfat (SDS)	200 µl	
	10% Ammoniumpersulfat (APS)	200 µl	} Unmittelbar vor Gebrauch zugefügt
	TEMED	8 µl	

<u>Sammelgel:</u>	dH ₂ O	6,8 ml	
	30% Acrylamid	1,66 ml	
	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,26 ml	
	10% SDS	100 µl	
	10% APS	100 µl	} Unmittelbar vor Gebrauch zugefügt
	TEMED	10 µl	

3.2.8.2 Gelelektrophorese

Das zu ladende Volumen der einzelnen Proben wurde so gewählt, dass sich in jeder Vertiefung 25 µg Proteine befanden. Zum Denaturieren der Proteine wurden die Proben zuvor 10 Minuten bei 95 °C mit derselben Menge Ladepuffer inkubiert. Das darin enthaltene SDS besitzt, vor allem nach vorherigem Reduzieren der Proteine durch Dithiothreitol, die Fähigkeit Quartär-, Tertiär- und zum Teil auch Sekundärstrukturen zu zerstören.

3 Material und Methoden

2x Ladepuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8)

 4% SDS

 0,2% Bromphenolblau

 20% Glycerol

 20 mM DTT

Als Größenmarkierung wurden 10 µl Precision Plus Protein™ Standard verwendet. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer befüllt und für ca. 90 Minuten mit dem, auf 110 V eingestellten, Netzgerät verbunden.

Laufpuffer: 25 mM Tris

 250 mM Glycin

 0,1% SDS

3.2.8.3 Western blot

Nun wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulosemembran zwischen zwei Filterpapieren und zwei Schwämmen luftblasenfrei geschichtet. Mit einer Eisbox zur Kühlung wurde das Sandwich, zur Übertragung der Proteine auf die Membran, erneut in eine Kammer gespannt. Für eine Stunde wurde das Netzgerät, nach Zugabe des Transferpuffers in die Kammer, wieder mit 110 V betrieben.

Transferpuffer: 25 mM Tris

 192 mM Glycin

 20 % Methanol

Im Anschluss musste die nun an der Membran haftenden Proteine 30 Minuten mit 5%iger Lösung aus fettarmem Trockenmilchpulver blockiert werden.

Nach entsprechender Verdünnung des primären Antikörpers (siehe 3.1.6) in ebenfalls 5%iger Milch, wurde die Membran mit diesem über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Sowohl vor als auch nach Inkubation mit 1:3000 verdünntem, sekundärem Antikörper mit 5%iger Milch bei Raumtemperatur, wurde die Membran für 30 Minuten in Waschpuffer gespült und dieses alle 10 Minuten ausgetauscht.

3 Material und Methoden

Waschpuffer: 1x PBS

0,1% Tween[®] 20

Zum Entwickeln der Banden wurde 1 ml SuperSignal[®]WestFemto Chemilumineszenz-Substrat auf die Membran gegeben und mit dem ImageQuant Las 4000 digitale Bilder erstellt.

3.3 Statistik

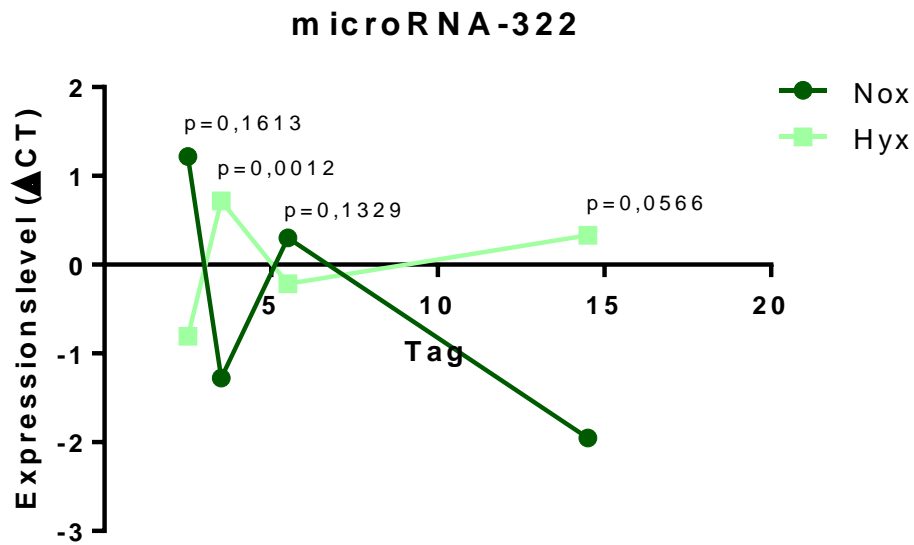
Die Auswertung der *real time-RT-PCR*-Daten erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism Version 5. Zur Prüfung der Signifikanz wurde der *Student's t-test* angewandt, um die p-Werte zu berechnen und deren Ergebnisse im Folgenden als Säulendiagramme dargestellt. Die breite Säule zeigt jeweils den Mittelwert an, die Standardabweichungen wurden durch dünne Fehlerbalken veranschaulicht.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionslevel von microRNA-322 und microRNA-497 im BPD-Modell

In Lungen von hyperoxie-exponierten neugeborenen Mäusen wurden die Expressionslevel der microRNA-322 und der microRNA-497 untersucht. Hierfür an 4 verschiedenen postnatalen Tagen (P2.5; P3.5; P5.5 und P14.5) aus dem Lungengewebe isolierte RNA, wurde der quantitativen *real-time RT-PCR* zugeführt. Im Vergleich zu Geweben von Mäusen aus normoxischen Bedingungen, zeigte sich für die microRNA-322 in Hyperoxie eine zickzackförmige, genau gegensätzlich verlaufende Expressionskurve. Sie war also an den Tagen P2.5 und P5.5 runter- bzw. an den Tagen P3.5 und P14.5 hochreguliert (siehe Abb.6A). MicroRNA-497 war an den ersten beiden getesteten Zeitpunkten P2.5 und P3.5 signifikant höher exprimiert als in den Kontrollen, erreichte an Tag P5.5 das gleiche Level und sank anschließend bis Tag P14.5 immer stärker, wobei das Level der Kontrolle weitestgehend stabil blieb (siehe Abb.6B).

A



B

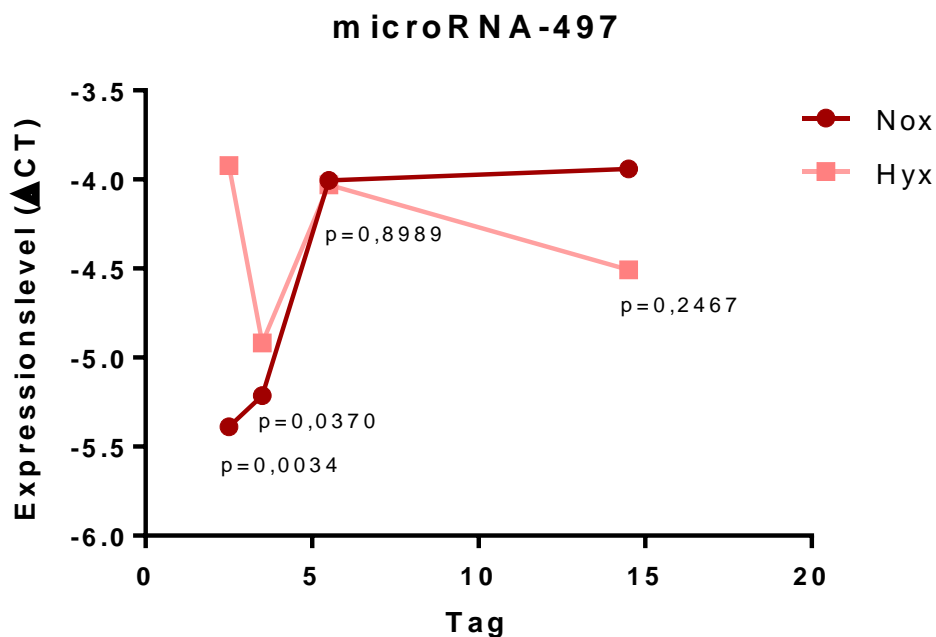


Abbildung 6 Verlauf der Expressionslevel von microRNA-322 und microRNA-497 an den ersten postnatalen Tagen bei Mäusen des BPD-Modells

Verglichen wurden je die Expressionslevel (Δ CT) von microRNA-322 (A) bzw. microRNA-497 (B) im Lungengewebe von Mäusen (n=6, je Gruppe, je drei Experimente), welche ab Geburt entweder 21% O₂ (Normoxie = NOX, dunkle Farbe/Punkte im Kurvenverlauf) oder 85% O₂ (Hyperoxie = HYX, helle Farbe/Quadrate im Kurvenverlauf; \pm BPD-Modell) ausgesetzt waren. Die, auf Grundlage der *real time RT-PCR*, mittels *Student's t-test* berechneten p-Werte der murinen Gewebeproben je 4 unterschiedlicher Zeitpunkte (postnataler Tag P2.5, P3.5, P5.5 und P14.5), wurden hier nur zur Veranschaulichung der dynamischen Veränderungen in einem Liniendiagramm dargestellt. P-Werte <0,05 gelten als signifikant.

4.2 Filtern von microRNA-Zielgenen

Es ergab sich die Frage, ob und wenn ja welche Konsequenzen variierende microRNA-Spiegel auf die Zelle haben und inwiefern sich solche auf das ganze Gewebe, den Organismus und insbesondere auf den pathologischen Verlauf im Zusammenhang mit dem Modell der BPD ausdehnen. Datenbanken, die durch unterschiedliche Algorithmen Vorhersagen über mögliche Zielgene von microRNAs treffen, wurden nach im Zusammenhang mit dem BPD-Modell interessanten Genen durchsucht.

MicroRNA-322

Mit Hilfe von *TargetScanHuman* wurde für die mmu-microRNA-322 bzw. hsa-microRNA-424 als Ziel u.a. das (Homologon des) Gen(s) des *retinoic acid receptor β* , kurz *RARB*, vorhergesagt (Tab. 5). Wie in Kapitel 1.4 nachzulesen, ist sein Ligand, die Retinsäure, und somit auch der Rezeptor selbst in Bezug zur Gewebeentwicklung, speziell in der Lunge, ein äußerst relevantes Protein. Zusätzlich konnte laut *rna22*, einem zum *Computational Medicine Center* der *Thomas Jefferson University* in Philadelphia gehörigen Programm (Miranda, Huynh et al. 2006), sowie laut *miRDB* (Wong and Wang 2015), bestätigt werden, dass mmu-microRNA-322 mit dem Homologon von *RARB* interagieren kann. Einen weiteren Hinweis, dass dies auch für das humane Pendant hsa-microRNA-424 und *RARB* zutrifft, gaben die Datenbanken der Programme *miRDB* (Wong and Wang 2015) und *miRWalk* (Dweep, Sticht et al. 2011), das von der Universität Heidelberg entwickelt wurde.

Tabelle 5 MicroRNAs und ihre prognostizierten Zielgene

Die mRNA des statistisch errechneten Zielgens bzw. seines Orthologons beim Menschen, dessen Sequenz in der Datenbank des NCBI eingesehen werden kann (siehe Kennnummer des Transkripts), kann mit einer humanen (hsa-) bzw. murinen (mmu-) microRNA durch teilweise Basenpaarung interagieren. Als repräsentative microRNA wird diejenige microRNA einer zum Gen kompatiblen Familie bezeichnet, welche den kleinsten *total context⁺ score* aufweist. *P_{CT}* (*probability of conserved targeting*) nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, umso näher an 1, desto größer also die Wahrscheinlichkeit, dass besagte microRNA auf das angegebene Gen abzielt. Für genauere Informationen zu den statistischen Werkzeugen siehe Quelle. (targetscan.org) (modifiziert)

Zielgen (hsa-miR) / Orthologon des Menschen (mmu-miR)	Kennnummer des Transkripts	Vollständiger Genname	Repräsentative microRNA	Total context ⁺ score	P _{CT}
<i>Rarb</i>	NM_000965	retinoic acid receptor, beta	mmu-microRNA- 322	-0.33	0.64
<i>RARB</i>	NM_000965	retinoic acid receptor, beta	hsa-microRNA- 424	-0.33	0.64
<i>Smurf2</i>	NM_022739	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	mmu-microRNA- 497	-0.17	0.79
<i>SMURF2</i>	NM_022739	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	hsa-microRNA- 497	-0.18	0.79

MicroRNA-497

Wie oben wurde auch mit mmu-microRNA-497 bzw. hsa-microRNA-497 verfahren. Das (Homologon des) Gen(s) von *SMURF2* wurde bei *TargetScanHuman* als Ziele prognostiziert (Tab. 5). Für mmu-microRNA-497 wurde *Smurf2* ebenfalls von weiteren Programmen (Miranda, Huynh et al. 2006) vorhergesagt. Das in den hier aufgeführten Genen kodierte humane oder murine Protein SMURF2 ist Bestandteil des TGF- β -Signalweges und agiert hier als Inhibitor. Auf die Mitwirkung des TGF- β -Signalweges bei Pathologien der BPD, wurde bereits in der Einleitung (Kapitel 1.5) eingegangen.

In den folgenden Kapiteln 4.3 bis einschließlich 4.5 werden zuerst die Ergebnisse von Versuchen mit der microRNA-322 vorgestellt, in weiteren Kapiteln anschließend die von microRNA-497 betreffenden Tests.

4.3 Expression des ausgesuchten Zielgens von microRNA-322 in NIH-Zellen nach Transfektion

Hervorragend zu kultivierende embryonale Mausfibroblasten der Zellreihe NIH wurden mit microRNA-322 transfektiert, um deren Einfluss auf das berechnete Zielgen zu begutachten. Evaluiert wurde die Expression sowohl auf mRNA-Ebene durch *real time RT-PCR* (Abb.7), als auch auf der, mit Hilfe von Immunblots dargestellten, Proteinebene (Abb.8). Es stellte sich heraus, dass auf keiner der Expressionsstufen signifikante Veränderungen eines der beiden untersuchten Gene, im Vergleich mit Kontrollen, nachgewiesen werden konnte. Interessanter Weise waren in der *real time RT-PCR* für *Rarb* (Abb.7), eher eine steigende, anstelle der erwartet sinkenden Tendenz zu sehen.

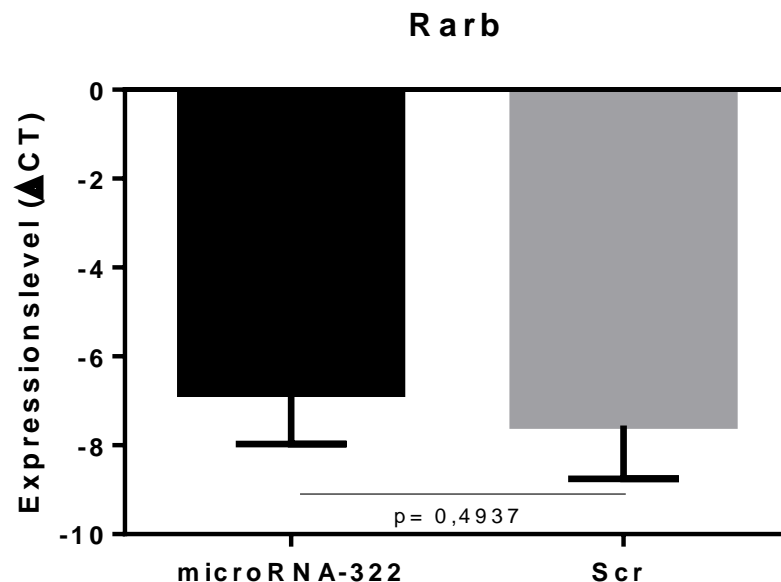


Abbildung 7 Expression der mRNA von *Rarb* nach microRNA-322 Transfektion von NIH-Fibroblasten

In der *real time RT-PCR*, wurden Expressionslevel (ΔCT) isolierter mRNA von *Rarb* (n=3, je Gruppe), aus mit microRNA-322 (schwarzer Balken) für 24 Stunden transfektierten NIH-Fibroblasten, mit denen mit *scrambled*-microRNA (Scr, grauer Balken) ebenso transfektierten Kontrollen verglichen. Ein im *Student's t-test* ermittelter p-Wert <0,05 ist als signifikant zu werten.

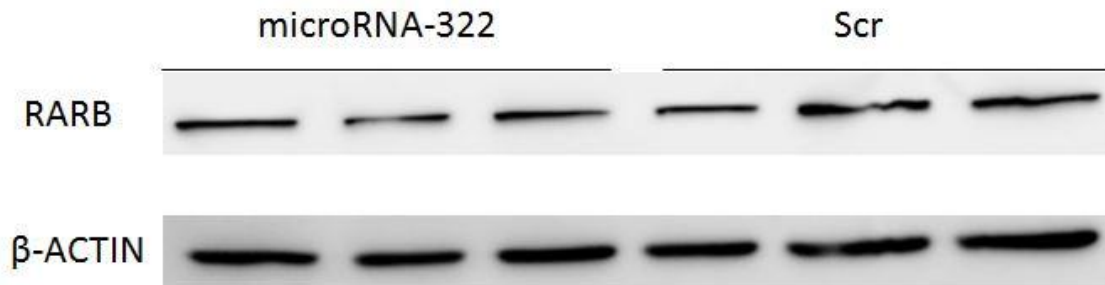


Abbildung 8 Unveränderte RARB-Expression nach Transfektion von NIH-Zellen mit microRNA-322

Nach der Proteinisolation, aus für 24 Stunden mit microRNA-322 bzw. unspezifischer microRNA (Scr = Kontrolle) transfektierten NIH-Zellen, wurde ein *western blot* angefertigt. Banden nach der Verwendung von Antikörpern gegen RARB werden oben, bzw. gegen Ladekontrolle β -ACTIN werden unten dargestellt. Auch in zwei weiteren Experimenten zeigten sich keine veränderten RARB-Proteinlevel im Vergleich mit Kontrollen.

Im Immunblot (Abb.8) eventuell minimal moduliert zu erkennende Bandenintensitäten (siehe je die letzten zwei Banden) zwischen microRNA-322-Proben und scr-microRNA-Proben, sind vermutlich eher auf nicht ganz exakt ausgeglichene Proteinmengen zurückzuführen (vgl. β -ACTIN).

4.4 *Rarb*-Expression in transfizierten pulmonalen Mausfibroblasten

Einen weiterer Versuch die Kommunikation zwischen der microRNA-322 und seinem proklamierten Zielgen *Rarb* zu eruieren, wurde mit pulmonalen Primärfibroblasten unternommen, die ebenfalls mit der microRNA-322, sowie unspezifischer microRNA als Kontrolle transfiziert wurden.

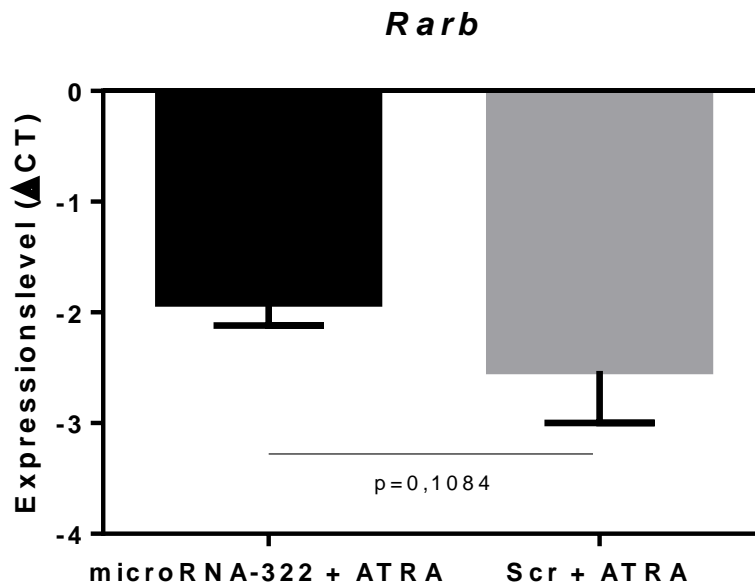


Abbildung 9 Auswirkungen der Transfektion mit microRNA-322 auf das Expressionslevel von *Rarb*-mRNA in Primärfibroblasten

Primäre pulmonale Mausfibroblasten wurden 24 Stunden mit microRNA-322 (schwarzer Balken) bzw. *scrambled*-microRNA (Scr = Kontrolle, grauer Balken) transfiziert und desweiteren alle Zellen mit ATRA (*all-trans retinoic acid*)-Lösung der Stoffmengenkonzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ stimuliert, was die Genexpression des getesteten *Rarb* insgesamt anregt. Die, durch *real time RT-PCR* (n=3, je Gruppe) generierten, relativen mRNA-Expressionslevel (ΔCT) von *Rarb* beider Gruppen, sind im obigen Balkendiagramm veranschaulicht. Der eingetragene p-Wert ist nicht signifikant, da laut *Student's t-test* $>0,05$.

Konträr zur Hypothese resultierte nach der *real time RT-PCR* ein Ergebnis, das abermals einen Aufwärtstrend der *Rarb*-Transkription trotz künstlich erhöhter microRNA-322-Level andeutete. Diese Abweichungen zwischen Experimental- (microRNA-322) und Kontrollgruppe (Scr) waren deutlicher als in der Fibroblastenzelllinie NIH (Kapitel 4.3), allerdings weiterhin nicht signifikant.

4.5 *In vivo*-Interaktion von microRNA-322 und *Rarb*

Nachdem, sowohl nach Transkription, als auch nach Translation in transfizierten Zellen der Zellreihe NIH oder ebenfalls auf mRNA-Ebene pulmonaler Primärfibroblasten keine Modifikationen des Gens *Rarb* nachgewiesen werden konnten, sollten die Konsequenzen für die Zielgenexpression bei angestiegenen microRNA-Level *in vivo* betrachtet werden. Wie in Abb.6A zu erkennen, trifft diese Veränderung der microRNA-Level am dritten postnatalen Tag in Mäuselungen zu, welche seit ihrer Geburt einer Hyperoxie (85% O_2) ausgesetzt waren.

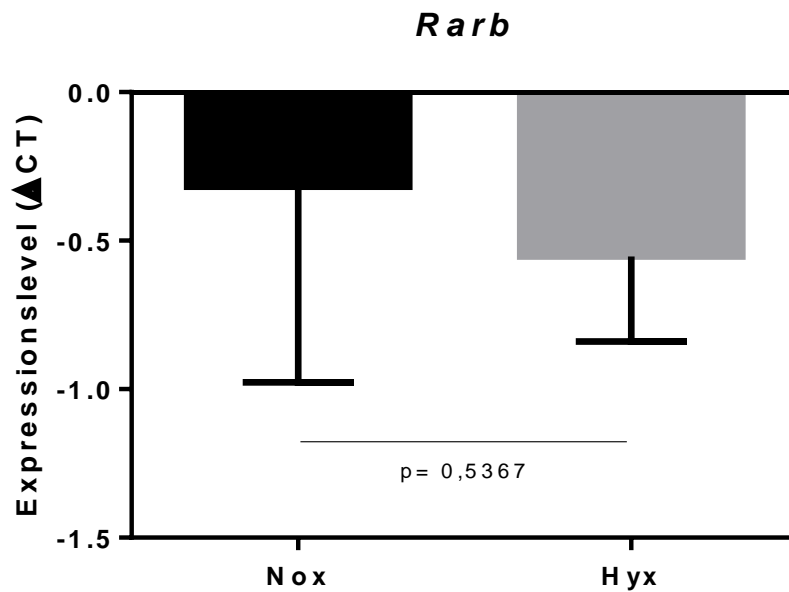


Abbildung 10 *Rarb* Expressionslevel in Mäusen des BPD-Modells am postnatalen Tag P3.5

In der *real time RT-PCR* zum Vergleich herangezogen, wurde RNA aus murinem Lungengewebe, welches am postnatalen Tag P3.5 Normoxie- (Nox, schwarzer Balken) oder Hyperoxie- exponierten (Hyx, grauer Balken) Mäusen (n=6, je Gruppe) entnommen wurde. Mittels *Student's t-test* verglichen wurden mRNA-Expressionslevel (ΔCT) von *Rarb*. Als signifikant gilt ein p-Wert $<0,05$.

Erneut brachte eine *real time RT-PCR* keine eindeutigen Resultate. Im Vergleich zu Normoxie-Gewebe, war lediglich eine sinkende Tendenz der Expressionslevel zu erkennen (Abb.10). Nach weiterer Bemühung, in 4 unabhängigen Experimenten an Gewebematerialien des BPD-Modells auf Proteinebene, die oben erstgenannte Hypothese zu untermauern, konnten noch immer keine kohärenten Tendenzen abgebildet werden.

4.6 Transfektion von A549-Zellen mit microRNA-497 und die Auswirkungen auf Zielgentranskription

Um die Interaktion zwischen prognostiziertem Zielgen und der microRNA-497 darzustellen, wurde diese in kultivierte Adenokarzinomzellen der Zelllinie A549 eingebracht und anschließend mit extrahierter RNA eine quantitative *real time RT-PCR* durchgeführt. Im Vergleich zu humanen A549-Zellen, welche zur Negativkontrolle mit unspezifischer microRNA transfiziert wurden, zeigten die mit microRNA-497 transfizierten Zellen signifikant geringere Expressionslevel des Gens *SMURF2* (Abb. 11).

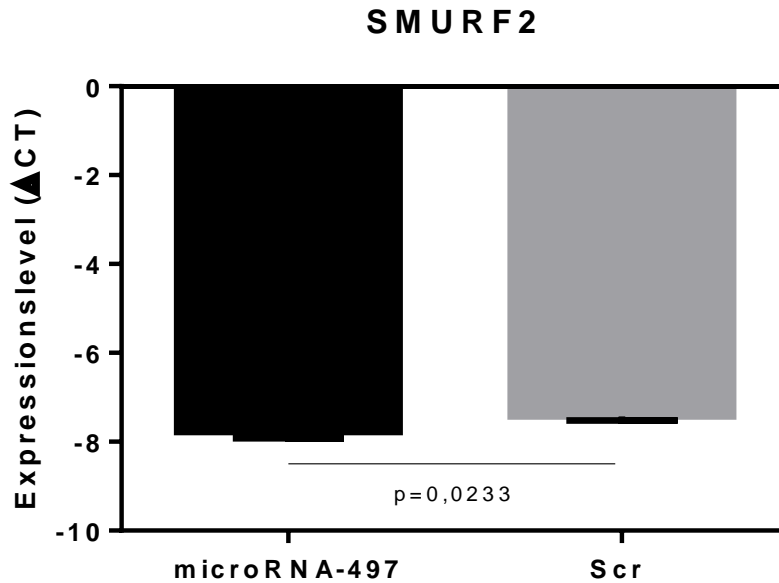


Abbildung 11 Zielgentranskription in A549-Epithelien nach Transfektion mit microRNA-497

Humane Epithelien der Zelllinie A549 wurden für 48 Stunden mit microRNA-mimic (microRNA-497, schwarz oder Scr = Kontrolle, grau) inkubiert und darauffolgend die Expressionslevel der mRNA von *SMURF2* durch eine quantitative *real time RT-PCR* (n=3, je Gruppe), analysiert. Das Balkendiagramm für *SMURF2* zeigt einen p-Wert <0,05, welcher auf eine signifikant verminderte Transkription nach microRNA-497-Transfektion laut angewandtem *Student's t-test* hinweist. Dieser Trend ergab sich auch in zwei weiteren Untersuchungsdurchläufen.

4.7 Prüfen der Übertragbarkeit veränderter *SMURF2*-Expressionslevel auf Proteinebene

Biologisch relevante Veränderungen von Zellprozessen können zumeist nur von Proteinen bewirkt werden. Also sollte im nächsten Schritt demonstriert werden, dass sich die verminderten Expressionslevel auch auf Proteinebene widerspiegeln. Von Neuem wurden A549-Zellen transfiziert. Anstatt RNA wurden Proteine isoliert und diese mit Hilfe der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Nach *western blotting* konnte, durch das Entwickeln der Membran, eine Aussage über die Expressionslevel von *SMURF2* getroffen werden.

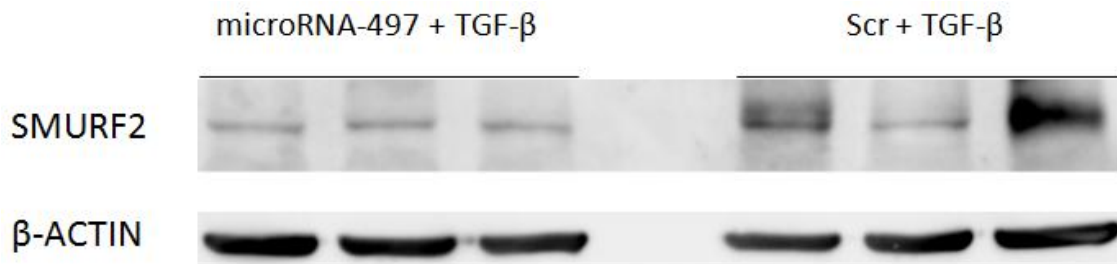


Abbildung 12 Reduzierte SMURF2- Expression durch microRNA-497 in Zellen der Linie A549

Die Proteinbanden von SMURF2 waren deutlich weniger intensiv, wenn Zellen über 48 Stunden höheren Konzentrationen von microRNA-497 ausgesetzt waren, als es in Zellen mit nur unspezifischer microRNA-Transfektion (Scr) der Fall war. In den hier verwendeten humanen Epithelien der Zelllinie A549, unabhängig von der Behandlung gleichmäßig stark exprimiertes β -ACTIN, wurde als Ladekontrolle genutzt. Weitere vier Experimente stützten diese Tendenz. Um insgesamt die Genexpression von SMURF2 anzukurbeln und so gegebenenfalls Unterschiede klarer ersichtlich zu machen, wurden in diesem Versuchsdurchlauf alle Zellen für 30 Minuten mit 5 ng/ml TGF- β stimuliert.

Während die Ladekontrolle β -ACTIN sowohl in mit microRNA-497 inkubierten Zellen, als auch in Kontrollzellen gleichmäßig satt angefärbte Banden zeigte, war die Intensität der Banden von SMURF2 in microRNA-497-Zellen in zwei von drei Fällen erkennbar geringer (Abb.12), was auf eine verminderte Proteinexpression hinwies.

4.8 Expression von Smurf2 im Lungenhomogenat von Mäusen des BPD-Modells

Bestrebung der nächsten Untersuchung war, die Wechselbeziehungen zwischen Umweltbedingungen, veränderter microRNA-Expression und so regulierter Zielgene auch *in vivo* aufzuzeigen. Übermäßige O_2 -Exposition sich noch entwickelnder Mäuselungen müsste, über die in vorherigen Kapiteln beschriebenen Interaktionen, zur gedrosselten SMURF2-Produktion führen. Allerdings ließ sich zunächst, im Vergleich von Lungenhomogenaten aus Normoxie und Hyperoxie, diese Verbindung nicht unmittelbar folgern.



Abbildung 13 Gesteigerte SMURF2- Proteinlevel in Mäuselungen nach postnataler Hyperoxie

Zum Zeitpunkt P3.5 wurden Lungengewebe von je drei Mäusen, welche entweder Normoxie (Nox = 21% O_2) oder Hyperoxie (Hxy = 85% O_2) ausgesetzt waren, in Bezug auf ihre SMURF2-Proteinlevel untersucht. In den ersten beiden hyperoxischen Proben sind die Banden sichtlich kräftiger, als die Vergleichsproben der Normoxie-Gruppe. Die unteren Banden zeigen die ausgeglichene Ladekontrolle β -ACTIN. Das Experiment wurde zweimal wiederholt.

4.9 Folgen für die TGF- β Signalübertragung

Da SMURF2 einen Regulator des TGF- β -Signalweges darstellt, wurde anschließend versucht konkrete Auswirkungen der Regression von SMURF2 auf diesen zu objektivieren und so zu verifizieren.

4.9.1 Forcierte Expression beteiligter Gene

Betrachtet wurde erneut zuerst die mRNA-Ebene von, dem TGF- β -Rezeptor direkt nachgeschalteten, Hilfsmolekülen. Die geringere Inhibition des Rezeptors durch Suppression von SMURF2, sollte zur verstärkten Expression von SMAD2 und SMAD3 führen. Wie in 4.6 und 4.7 demonstriert, kommt es durch microRNA-497-Transfektion epithelialer A549-Zellen zu dieser Suppression. Nach äquivalenter Behandlung von A549-Epithelien präsentieren die Abbildungen 14A und B die Ergebnisse der *real time RT-PCR*. Der p-Wert bestätigte die Signifikanz der erwarteten Expressionssteigerung für SMAD3, nicht jedoch für SMAD2, im Vergleich mit Kontrollzellen.

4 Ergebnisse

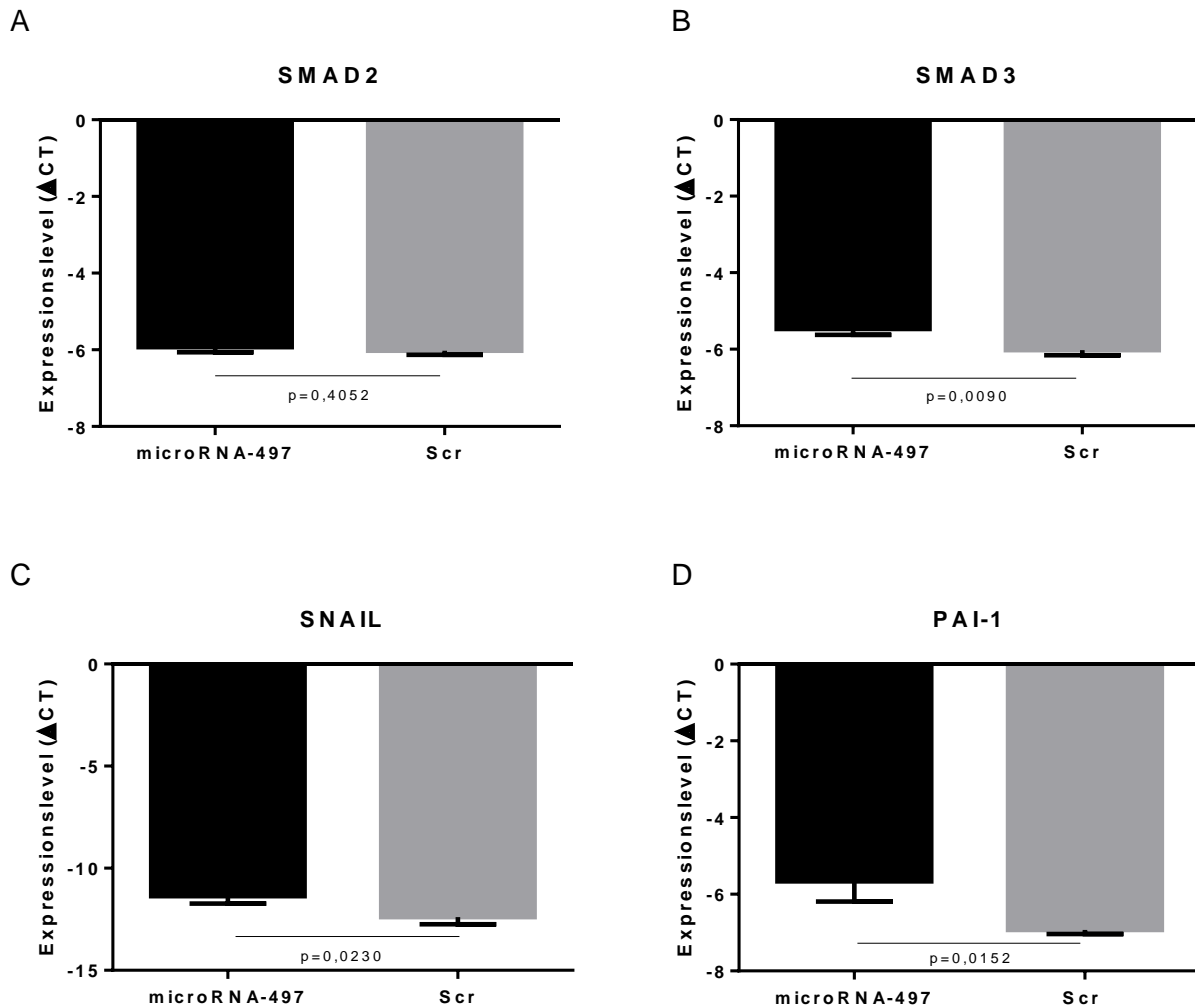


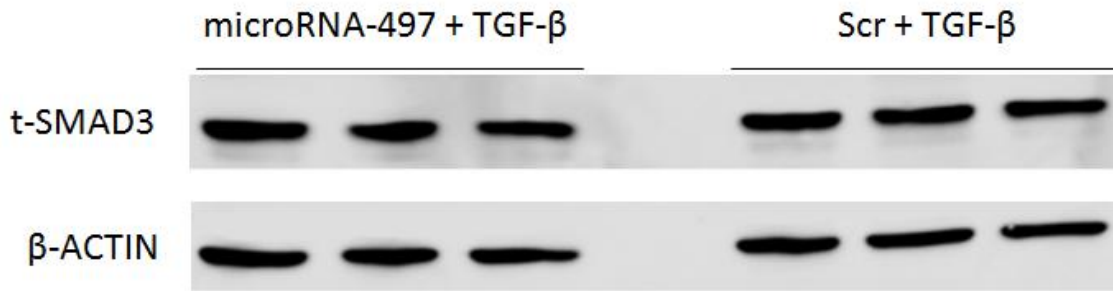
Abbildung 14 Relative Expressionslevel der mRNA TGF- β -abhängiger Gene nach microRNA-497-Transfektion von A549-Zellen

Analysiert durch *real time RT-PCR* ($n=3$, je Gruppe) wurden mRNA-Expressionslevel von Molekülen, welche abhängig von der TGF- β -Aktivierung variieren (A-D: *SMAD2* und *SMAD3*, *SNAIL*, *PAI-1*). p-Werte $<0,05$ zeigen signifikante Unterschiede zwischen den für 48 Stunden mit microRNA-497 transfektierten A549-Zellen (schwarze Balken) und den mit *scrambled*-microRNA (Scr) beimpften Kontrollen (graue Balken). Berechnet wurde mittels *Student's t-test*.

Das *SNAIL*-Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor SNAIL (Abb. 14C), welcher Teil des TGF- β -Signalweges ist und ebenso als Folge dessen vermehrt exprimiert wird. Eine solche Vermehrung der mRNA ließ sich in den hier untersuchten, mit microRNA-497 transfektierten A549-Zellen aufweisen. Weiterhin zur Validierung in dieser Versuchsreihe begutachtet, wurde der ebenfalls TGF- β -abhängige Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (*PAI-1*). Wieder entpuppte sich die Transkription als signifikant gesteigert (Abb. 14D).

4 Ergebnisse

A



B

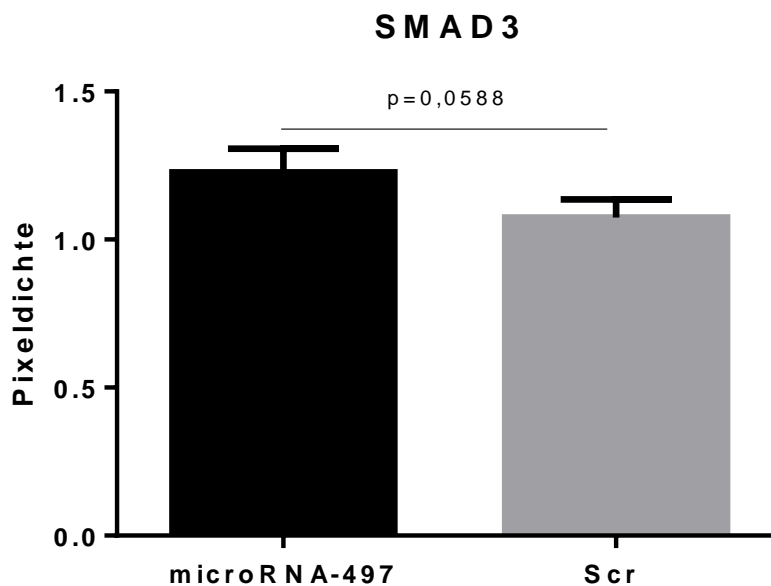


Abbildung 15 Proteinbiosynthese von total-SMAD3 in epithelialer A549-Zellreihe nach Transfektion mit microRNA-497

Proteinbiosynthese von total-SMAD3 in epithelialer A549-Zellreihe nach Transfektion mit microRNA-497 oder *scrambled*-microRNA (Scr) für 48 Stunden und TGF- β -Stimulation für 10 Minuten (5 ng/ml). (A) Immunblot mit Ladekontrolle β -ACTIN (einmaliger Versuchsdurchlauf ohne und zweimaliger Versuchsdurchlauf mit TGF- β -Stimulation). (B) Mit Hilfe des Programms ImageJ konnten, die proteinexpression-darstellenden Bandenintensitäten des Immunblots, in Zahlenwerten quantifiziert werden. Anschließend wurden für beide Gruppen (microRNA-497 und Scr) die Verhältnisse t-SMAD3/ β -ACTIN gebildet. Der Vergleich beider Gruppen bzw. ihrer Verhältnisse, wurde im oben stehenden Balkendiagramm als relative Pixeldichte veranschaulicht. Der durch den *Student's t-test* ermittelte p-Wert zeigt eine grenzwertig nicht signifikant ($p > 0,05$) erhöhte Proteinbiosynthese von SMAD3 in transfizierten Zellen.

Im anschließenden Versuch sollte die in Abb. 14B eindeutig signifikant erhöhte Genexpression von *SMAD3* auch auf Proteinebene dargelegt werden. Denn nur über die rezeptorassoziierten SMAD-Proteine kann im weiteren Verlauf des Signalweges von TGF- β , in die Genexpression und so in etwaige Entwicklungsprozesse einzelner Zellen bzw. im Endeffekt ganzer Gewebe eingegriffen werden. Dies war nach *western blotting* nicht mit bloßem Auge ersichtlich (Abb. 15A) und gleichermaßen ergab die Quantifizierung der Banden-

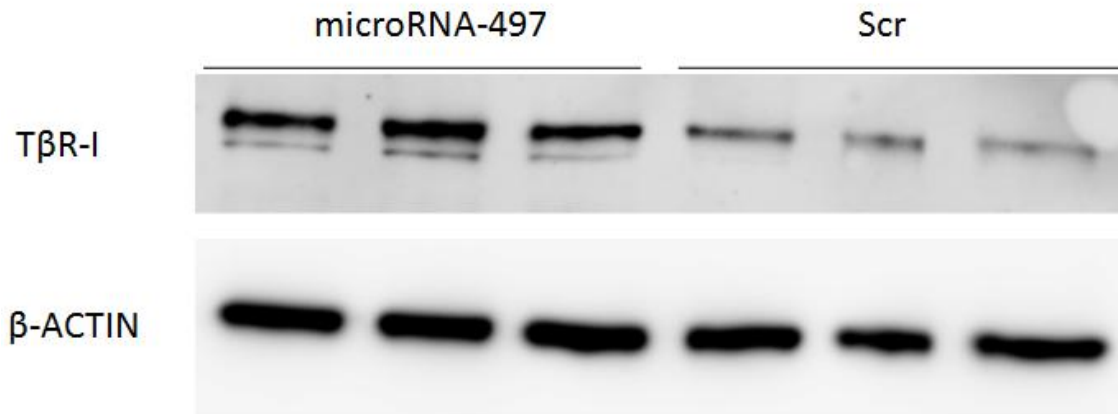
intensitäten - wenn auch knapp - keine signifikante Zunahme der Biosyntheselevel gegenüber Kontrollen (Abb. 15B).

4.9.2 Enthemmte Aktivierung des TGF- β -Signalweges

Nachdem kein Unterschied der reinen *SMAD2*-Expression durch microRNA-497-Transfektion erreicht werden konnte (Abb. 14A) und dies auf Proteinebene nun auch für *SMAD3* nicht signifikant darzustellen war (Abb. 15), blieb zu klären, ob aber deren Aktivierung - erkennbar an der Phosphorylierung - enthemmt ist. Dieses Phänomen wäre, wie in Kapitel 1.5.1 zu lesen, durch die Regression von *SMURF2* und so die Enthemmung des gesamten Signalweges erklärbar. Zunächst konnte zusätzlich ein Anstieg der TGF- β -Rezeptor-I-Synthese, in wie zuvor kultivierten A549-Zellen, nachgewiesen werden (Abb. 16A). Die nachfolgend bestätigte Anreicherung von phosphoryliertem *SMAD2*, welche in Abb. 16B zu sehen ist, verweist auch auf eine belebtere Aktivierung dieses, direkt für die Phosphorylierung verantwortlichen, Rezeptors.

4 Ergebnisse

A



B



Abbildung 16 Nach Transfektion von A549-Epithelien mit microRNA-497 kommt es zu TβR-I-Überexpression und vermehrter Phosphorylierung von SMAD2

Western blots mit aus A549-Zellen extrahierten Proteinen, nach 30-minütiger TGF-β-Stimulation aller Zellen. Je drei Proben der, entweder mit microRNA-497 oder mit unspezifischer microRNA (Scr), für 48 Stunden transfektierten Gruppen. Die Banden der analysierten Proteine, TβR-I (A, zwei Experimente), p-SMAD2 und t-SMAD2 (beide B, je drei Experimente), werden jeweils oberhalb der Ladekontrolle β-ACTIN präsentiert.

Um zwischen der gesamten Menge von SMAD2 (t-SMAD2) und dem Anteil an phosphoryliertem SMAD2 (p-SMAD2) zu differenzieren, wurde auch hierfür ein Immunblot durchgeführt. Dieser zeigte, vergleichbar mit den β-ACTIN Ladekontrollen, ausgeglichene Proteinlevel von t-SMAD2 in allen 6 Proben (Abb. 16B). SMURF2 hat also dem Anschein nach Einfluss auf den Verlauf des Signalweges, auch ohne dabei die Gesamtmenge beteiligter Hilfsmoleküle zu verändern.

4.10 Der Einfluss von TGF- β auf epitheliale Zellverbände

Wachstumsfaktoren wie TGF- β induzieren, neben dem im Namen bereits festgehaltenen Wachstum, gleichfalls Differenzierung und Zelltod. Ein sowohl physiologisch, als auch pathologisch beschriebener Effekt auf Epithelien besteht in der Epithelialen-Mesenchymalen Transition. Durch testen spezifischer Markerproteine für EMT, konnte dieser Mechanismus in der auch zuvor verwendeten humanen epithelialen Zelllinie A549 authentifiziert werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit TGF- β -Lösung wurden *real time RT-PCRs* für die mRNA-Expressionslevel der Marker E-CADHERIN und N-CADHERIN, sowie α -SMA bewertet.

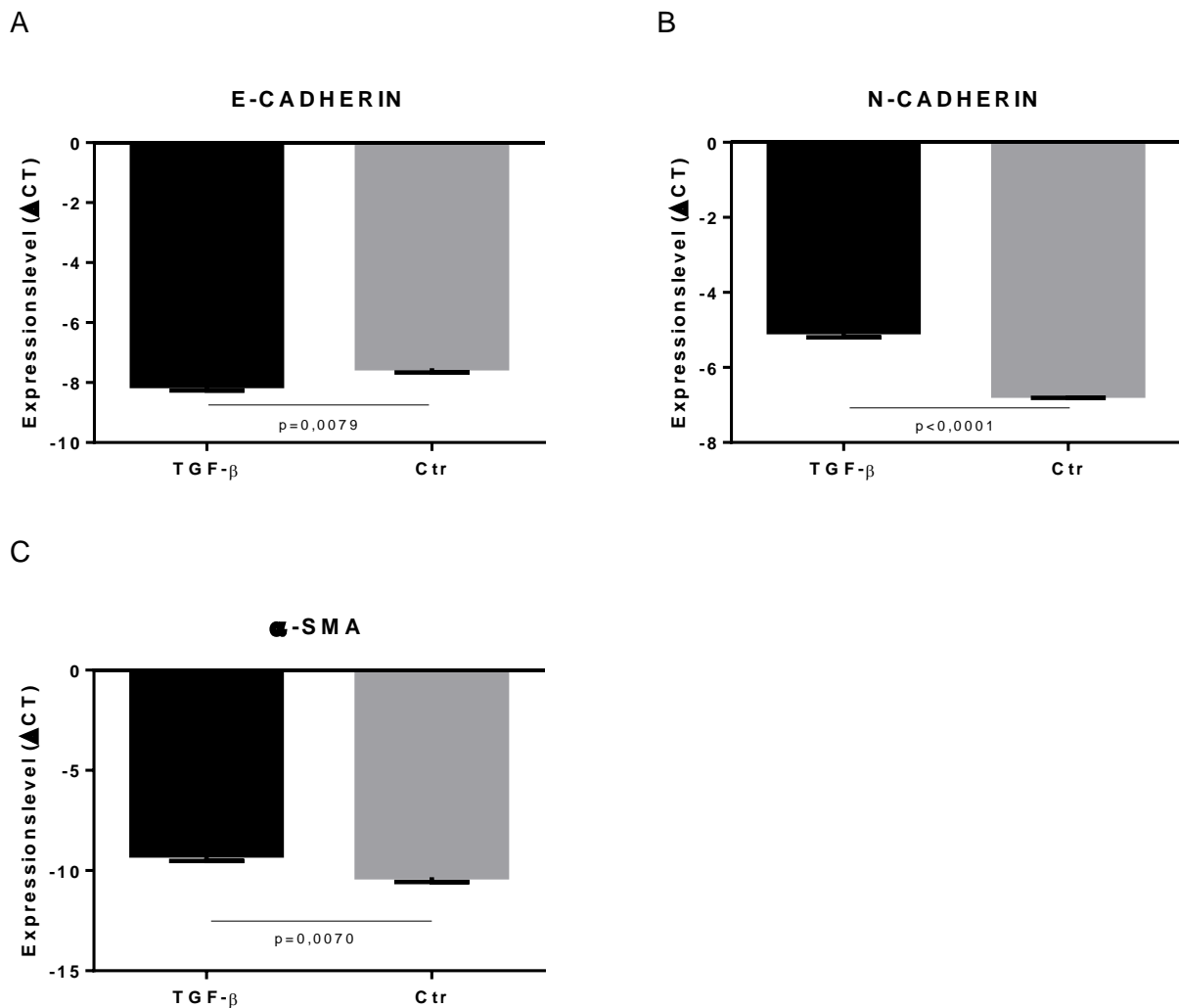


Abbildung 17 Einfluss von TGF- β auf EMT-Marker-Genexpression in A549-Zellen

Real time RT-PCRs (n=3, je Gruppe) von A549-Zellen, die über 24 Stunden entweder in einer TGF- β -Lösung (schwarze Balken) der Konzentration 5 ng/ml, oder normalem Medium (Ctr = Kontrolle, graue Balken) inkubiert waren. Untersucht wurden die EMT-Marker *E-CADHERIN* (A) bzw. *N-CADHERIN* (B) und α -SMA (C). Differenzen in den relativen mRNA-Expressionsleveln (Δ CT) gelten als signifikant, sobald mittels *Student's t-test* ermittelte p-Werte <0,05.

4 Ergebnisse

Wie vermutet war das mRNA-Expressionslevel des epithelialen Adhäsionsproteins E-CADHERIN gesunken (Abb. 17A), wenn es mit unbehandelt kultivierten Kontrollen verglichen wurde. Wohingegen die Transkription des fibroblasten-typischen N-CADHERINs hochreguliert war (Abb. 13B). In Abb. 17C zu erkennen ist die gleichermaßen signifikante Expressionssteigerung der mRNA von α -SMA, einem auf dem *ACTA2*-Gen kodiertem Protein, das in glatten Muskelzellen zur Kontraktion beiträgt und auch in spezialisierten Fibroblasten zu finden ist.

Im folgenden Versuch wurde zusätzlich einmal umgekehrt die Wirkung von TGF- β auf die microRNA-497 betrachtet. Nach der Stimulation waren die mRNA-Expressionslevel signifikant herabgesetzt, was durch eine negative Autoregulation des Signalweges zu erklären wäre.

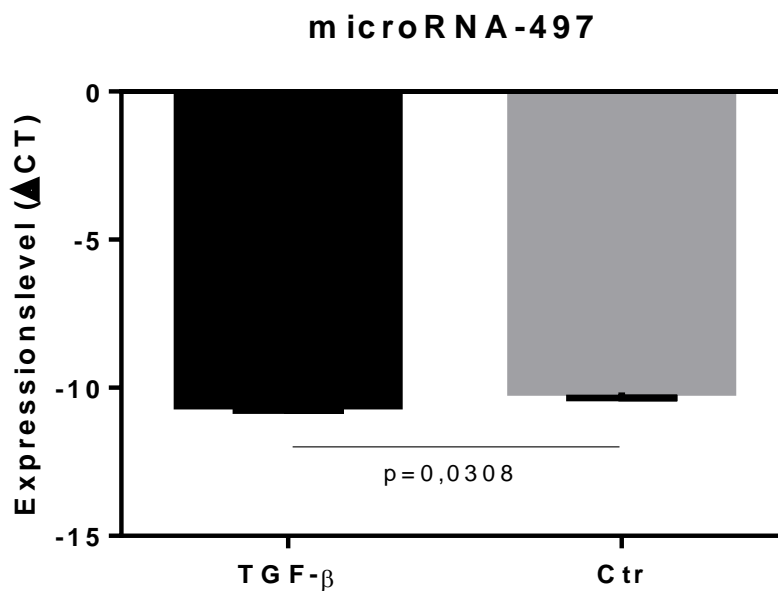


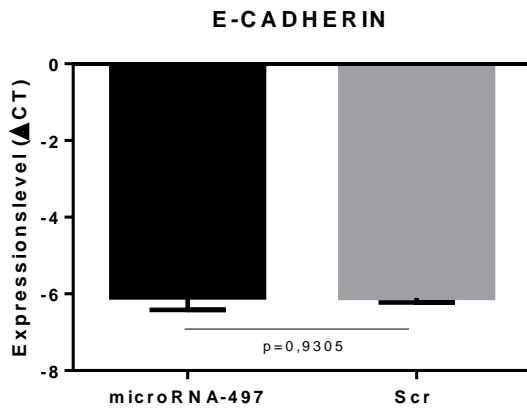
Abbildung 18 Auswirkung der TGF- β -Stimulation von A549-Zellen auf die Expression von microRNA-497

Die Stimulation von A549-Epithelzellen mit 5 ng/ml TGF- β für 24 Stunden bewirkt ein geringes, jedoch signifikantes Absinken der Expressionslevel von microRNA-497, wenn verglichen mit einer unstimulierten Kontrollzellreihe. Ersichtlich ist dies in obiger durch *Student's t-test* ausgewerteter *real-time RT-PCR* (n=3, je Gruppe), die einen signifikanten p-Wert (<0,05) zeigt.

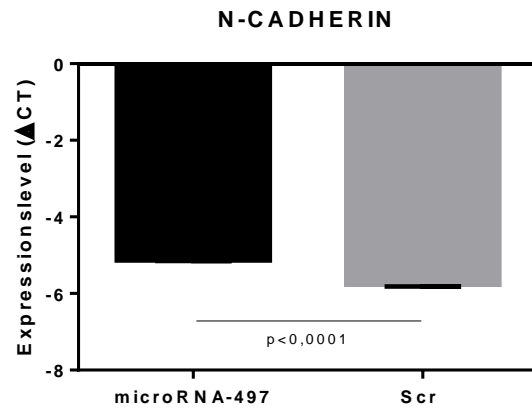
Äquivalente Ergebnisse wie nach TGF- β -Stimulation konnten für *N-CADHERIN* (Abb. 19B) und α -SMA (Abb. 19C) in A549-Zellen nach Transfektion mit microRNA-497 erzielt werden. Signifikante Abweichungen der Expression von *E-CADHERIN* konnten in diesem Versuch jedoch nicht dokumentiert werden (Abb. 19A).

4 Ergebnisse

A



B



C

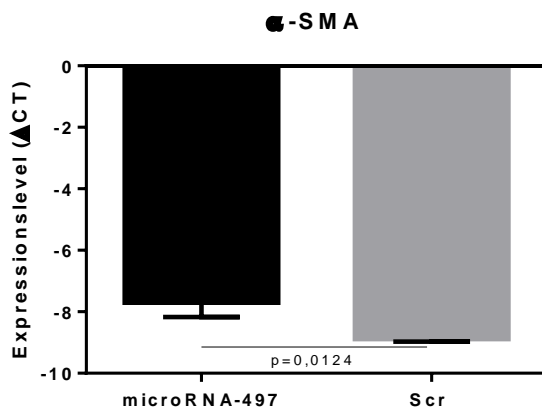


Abbildung 19 Einfluss von microRNA-497 auf EMT-Marker-Expression in A549-Zellen

Durch *real time RT-PCR* ($n=3$, je Gruppe, je zwei Versuche) und anschließend durchgeführten *Student's t-test* gegenübergestellt, wurde die mRNA-Expression (ΔCT) der Transmembranmoleküle E-CADHERIN (A) und N-CADHERIN (B), sowie von α -SMA (C) in A549-Epithelien. Entweder nach Transfektion mit microRNA-497 oder *scrambled*-microRNA (Scr = Kontrolle) für je 48 Stunden. Die p-Werte in (B) und (C) sind als signifikant zu werten, da $<0,05$.

Im Anschluss an obige Tests auf mRNA-Ebene wurden Anstrengungen unternommen, die Verbindung zwischen microRNA-497, TGF- β -Inhibitor SMURF2 und TGF- β -getriggelter EMT weiter zu bekräftigen. Dies gelang zunächst durch den Immunblot mit α -SMA, der dessen zunehmende Expression in A549-Epithelien nach microRNA-497 Transfektion auf Proteinebene bestätigte (Abb. 20).



Abbildung 20 Expression von α -SMA in microRNA-497 transfizierten Epithelien der Zelllinie A549

Immunblot mit Antikörpern gegen α -SMA oder β -ACTIN (als Ladekontrolle). Benutzt wurden Proteine aus microRNA-497 oder *scrambled*-microRNA (Scr, Negativkontrollen) beimpften und so 48 Stunden kultivierten A549-Zellen. Additional wurden beide Gruppen mit TGF- β (5 ng/ml) für 30 Minuten stimuliert.

4.11 Veränderte EMT-Marker-Expression in murinen ATII-Zellen nach microRNA-497-Transfektion

Abschließend wurden aus gesunden Mäuselungen Alveolarepithel-Typ-II-Zellen isoliert, kultiviert und in ähnlicher Weise mit microRNA-497 transfiziert. Nach RNA-Isolation wurden noch einmal *real time RT-PCRs* durchgeführt, um die zuvor in der humanen Karzinomzellreihe A549 dargestellten Zusammenhänge nun durch Experimente mit physiologischen Primärzellen untermauern zu können.

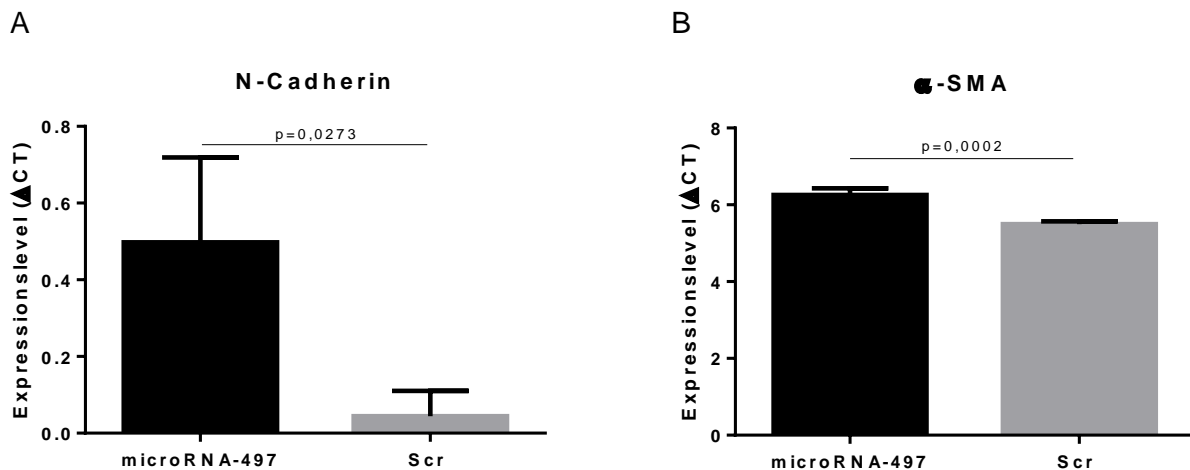


Abbildung 21 Einfluss von microRNA-497 auf EMT-Marker-Genexpression in ATII-Zellen

Expressionslevel (Δ CT) der mRNA nach *real-time RT-PCR* (n=3, je Gruppe, je zwei Versuche), für die Proteine N-CADHERIN (A) und α -SMA (B), in Abhängigkeit der Transfektion von ATII-Zellen mit microRNA-497 oder unspezifischer microRNA (Scr) als Kontrolle. Signifikante Abweichungen der relativen Expressionslevel können an, durch den *Student's t-test* berechneten, p-Werten <0,05 erkannt werden.

Dies gelang mit beiden in Abbildung 21 vorgestellten EMT-Markern. *N-Cadherin*, genauso wie α -SMA, wurden eindeutig signifikant stärker exprimiert, wenn ATII-Zellen mit microRNA-497 transfiziert wurden, als es in Kontrollzellen der Fall war.

5 Diskussion

Viel hat sich getan in den letzten Jahrzehnten in den Behandlungsweisen von Frühgeborenen. Man kann hier tatsächlich von einem ganzheitlichen Ansatz sprechen, an dem gearbeitet wurde. So hat sich das sogenannte „*minimal handling*“ in der Pflege, aber auch bei ärztlichen Interventionen, durchgesetzt (Murdoch and Darlow 1984, Latini, De Felice et al. 2003). Interesse besteht auch daran, das *Outcome* von Wachstum und Organentwicklung durch gut an die Bedürfnisse angepasste Ernährungsstandards zu verbessern (Sluncheva 2010, Klingenberg, Embleton et al. 2011). Selbstverständlich wird gleichfalls versucht die typisch intensivmedizinische Behandlung weiter zu optimieren. Beispielsweise werden Beatmungsstrategien immer wieder an neueste Erkenntnisse angepasst (Thomson, Yoder et al. 2004). Dies hat die Überlebenschancen von immer kleineren Kindern ermöglicht. Im Falle der BPD hat sich die Pathophysiologie der Krankheit ein Stück weit verändert, aber deren Inzidenz nicht unbedingt stark abgenommen (Coalson 2006, De Paepe, Mao et al. 2006). Für die Wissenschaft heißt es also, durch fortschreitende Aufklärung von grundlegenden, molekularen Prozessen, neue Therapieoptionen ausfindig zu machen. In der vorliegenden Studie wurde das Zusammenspiel zweier microRNAs mit den, in der BPD zuvor als pathophysiologisch relevant beschriebenen, Signalwegen von RA und TGF- β beleuchtet, sowie die darauffolgende Reaktion von Lungengewebe anhand eines Mausmodells beobachtet.

5.1 Auswirkungen auf die Signaltransduktion der Retinsäure

Die Hypothese, dass microRNA-322 die Expression von RA-Rezeptor- β als sein Zielgen deutlich reguliert und so den RA-Signalweg moduliert, konnte hier nicht belegt werden. Der Vitamin A-Signalweg ist essenziell für die regelrechte Entwicklung des Menschen. Das zeigten bereits mehrere Studien, die sich mit dem Mangel dieses Vitamins, zunächst im Tiernmodell und im Verlauf auch in klinischen Studien, beschäftigten (Chen, Cao et al. 2010). Kommt es zur Defizienz oder einer Mutation im Signalweg, entstehen Schäden an verschiedenen Organsystemen wie z.B. dem Zentralen Nervensystem, den Augen und auch der Lunge (Golzio, Martinovic-Bouriel et al. 2007, Gavrilova, Babovic et al. 2009). Deshalb besteht nach wie vor ein großes Interesse daran, weitere Zusammenhänge, auch mit anderen Signalwegen, aufzudecken. Die Hypovitaminose A gehört weltweit zu den häufigsten ernährungsbedingten Mangelzuständen (Chen, Cao et al. 2010). Bei Frühgeborenen, v.a. denjenigen, die vor der 30. SSW geboren werden und weniger als 1000g Geburtsgewicht haben, kommt es zu dem besonderen Missverhältnis, dass die noch nicht vollständig ausgereiften Organe dringend Nährstoffe brauchen, aber der ebenso unreife Gastrointestinaltrakt noch wochen-

lang nicht die volle Absorptionsfähigkeit besitzt (Tyson, Wright et al. 1999). Seit über 25 Jahren besteht nun die Option Vitamin A bei diesen Kindern zu supplementieren. Der positive Effekt auf chronische Lungenerkrankungen, z.B. die in dieser Arbeit thematisierte BPD, wurde auch immer wieder belegt, sowohl durch direkte Auswirkungen auf u.a. die Alveolenzahl, als auch indirekt über eine Stärkung des Immunsystems. Negative Effekte auf das neurologische *Outcome* oder sonstige Gefahren durch die Substitution wurden in weiten Teilen ausgeschlossen (Tyson, Wright et al. 1999, Ambalavanan, Tyson et al. 2005, Bland 2005). Doch nicht nur zur physiologischen Entwicklung, sondern auch in der speziellen Situation - diese Kinder benötigen aufgrund der Unreife teils eine künstliche Beatmung mit hohen Sauerstoffpartialdrücken - sind die Funktionen von Vitamin A relevant. So kann Retinolsäure auch als Antioxidans wirken und entstandene Sauerstoffradikale abfangen, die sonst Gewebeschäden verursachen könnten (Welty 2001, Cho, George et al. 2005). Da nun aber die alleinige Vitamin A-Gabe keine riesigen Sprünge in der Behandlung der Neonaten mit sich brachte, was man natürlich in einer multifaktoriellen Erkrankung wie der BPD auch nicht unbedingt erwartet hat, stellt sich dennoch die Frage, inwieweit auch interne Veränderungen im weiteren Signalweg zu einer besser definierten Nutzung von Retinolsäure führen können.

Eine signifikante Störung der Expression des spezifischen RA-Rezeptor- β aufgrund der, wie in Abb.6A dargestellt, postnatal dysregulierten microRNA-322-Level, konnte in den hier präsentierten Untersuchungen im Mausmodell nicht gezeigt werden. In der Forschung der Lungenenwicklung sind Modelle mit Nagern seit Längerem etabliert, da für die Alveolenreifung wichtige Prozesse hier erst postnatal ablaufen und so gut beobachtet oder auch gesteuert werden können (Londhe, Maisonet et al. 2013). Die microRNA-322 war im Lungengewebe hyperoxie-exponierter Mäuse in den ersten 14 Tagen der postnatalen Phase immer genau gegensätzlich reguliert, als es in der Normoxie-Kontrollgruppe der Fall war. Die bereits unter normoxischen Bedingungen stark variierende Expression der microRNA, welche ja per se regulatorische Aufgaben übernimmt, lassen vermuten, welche feinmodulierten Prozesse hier stattfinden. Da genau eine solche Variabilität auch in der Auslastung des Vitamin A-Signalweges im Laufe der prä- und postnatalen Entwicklung zu bestehen (Hind, Corcoran et al. 2002, Desai, Chen et al. 2006) und eine exakte Einstellung, sowie die intakte Beschaffenheit der Rezeptoren für die Alveolarisierung entscheidend zu sein scheint (Massaro, Massaro et al. 2000, McGowan, Jackson et al. 2000), läge die vorhergesagte Interaktion zwischen microRNA-322 und *Rarb* nahe. Doch weder in der mit microRNA-322 transfizierten Zellreihe (Abb.7), noch in transfizierten pulmonalen Primärfibroblasten von Mäusen (Abb.9) konnten signifikante Unterschiede in der Genexpression von *Rarb* dargestellt werden, welche sich im Folgenden auf die Signalkaskade von Vitamin A und seinen aktiven Metaboliten hätten auswirken können. Die Expressionslevel von *Rarb* tendierten sogar, entgegen der Erwartung an

ein Zielgen einer microRNA, eher zu einer vermehrten Expression. Abbildung 10 zeigt *in vivo* am dritten postnatalen Tag, an dem microRNA-322 im Lungengewebe hyperoxie-exponierter Mäuse deutlich signifikant hochreguliert ist, hypothesenschlüssig veränderte - also in diesem Fall geringere - mRNA-Expressionslevel des *Rarb*-Gens, jedoch ist auch hier das Ergebnis nicht statistisch relevant.

5.2 Mitglieder der microRNA-15-Familie in der Bronchopulmonalen Dysplasie

Trotz der in 5.1 diskutierten, unerwarteten Ergebnisse, ist mit einer bisher unentdeckten Auswirkung der außergewöhnlich fehlregulierten microRNA-322 in der BPD zu rechnen und die des RA-Signalweges zu Teilen bereits belegt, wenn auch beide wohl nicht in direktem Zusammenhang stehen. Ein möglicher Weg, wie RA die Lungenentwicklung beeinflusst, ist die Regulation des TGF- β -Signalweges (Alejandre-Alcázar 2007). Chen, Desai et al. fanden 2007 erhöhte T β RI- und Smad4-Level im Vorderdarm von Mausembryonen, nachdem der RA-Signalweg künstlich antagonisiert wurde (Chen, Desai et al. 2007). Ähnlich inhibitorische Effekte von Vitamin A auf die Transduktion von TGF- β wurden auch im Mesenchym des sich entwickelnden Innenohres und des Gaumens berichtet (Frenz and Liu 2000, Liu, Zhang et al. 2014). Durch Vitamin A-Supplementierung kann teilweise z.B. die Expression von p-Smad2 verringert werden und so kommt es im Verlauf auch zu einer verbesserten späten Lungenentwicklung (Albertine, Dahl et al. 2010). Doch in vorliegender Studie konnte gezeigt werden, dass die TGF- β -Signaltransduktion vermutlich ebenfalls über die microRNA-497 moduliert werden kann. Sie gehört wie microRNA-322 zur microRNA-15-Familie (Small, Frost et al. 2010) und ist im Lungengewebe dysreguliert, wenn dieses hyperoxischen Bedingungen (85% O₂) ausgesetzt war. Zhang et al. vermuteten bereits 2011, dass microRNA-497 in irgendeiner Form an der Alveolarisierung beteiligt ist, da sie zu den am stärksten exprimierten microRNAs während der Septierung zählt (Zhang, Peng et al. 2011).

5.3 Interaktion zwischen der microRNA-497 und ihrem Zielgen *SMURF2*

Im Mausmodell der BPD wurden am zweiten und dritten postnatalen Tag deutlich signifikant erhöhte Expressionslevel von microRNA-497 nachgewiesen (Abb.6B). In darauffolgenden Untersuchungen von A549-Epithelien, welche mit dieser microRNA-497 transfektiert wurden, zeigten sich, wie erwartet, signifikant niedrigere Expressionslevel des vorhergesagten Zielgenes *SMURF2* (Abb.11).

Humane A549-Zellen werden häufig für Untersuchungen im Zusammenhang mit Alveolarepithelien Typ II verwendet, da sie aufgrund ihres karzinomatösen Ursprungs hervorragend anzuzüchten sind und trotzdem noch immer einige typische Charakteristiken der AT-II-Zellen aufweisen (Foster, Oster et al. 1998, Higashimoto, Ohata et al. 2005, Jayachandran 2009).

Die Interaktion zwischen microRNA-497 und *SMURF2* ließ sich auch auf die Proteinebene übertragen (Abb.12). *SMURF2* ist eine *E3 ubiquitin protein ligase*, welche die Fähigkeit besitzt rezeptor-assoziierte SMAD-Proteine des TGF- β -Signalweges und in Kombination mit SMAD7 auch den T β R-I, wie der Name schon sagt, zu ubiquitinieren und so dem Abbau zuzuführen (Kavak 2000, Zhang 2001, Eichhorn 2013). Ein eingehendes Signal durch den TGF- β -Liganden wird nun nicht bis zum Zellkern übermittelt und nicht in einer veränderten Genexpression umgesetzt. Untersucht man allerdings die Proteinlevel von *SMURF2* direkt im Mausmodell, also vergleicht hyperoxie- und normoxie-exponierte Gewebe, präsentiert sich ein zunächst verwirrendes Ergebnis. *SMURF2* scheint in hyperoxischen Verhältnissen am Tag P3.5, an dem microRNA-497 noch immer deutlich stärker exprimiert wird als es bei Normoxie der Fall ist, nun gleichfalls verstärkt exprimiert zu werden. Ein naheliegender Erklärungsversuch hierfür könnte eine Art negativer Feedbackmechanismus sein, welcher im TGF- β -Signalweg an anderer Stelle bereits mehrmals beschrieben wurde. Wird der Signalweg forciert genutzt, kommt es unter anderem zu einer stärkeren Expression von SMAD7, das durch seine Interaktion mit den rezeptorassoziierten SMADs, teils in Kombination mit *SMURF2*, eine autoinhibitorische Wirkung entfaltet (Nakao, Afrakhte et al. 1997, Miyazono 2000, Zhao, Shi et al. 2000). Man kann vermuten, dass eine solche negative Rückkopplungsschleife auch für *SMURF2* besteht. Sodass es unter hypoxischen Bedingungen (85% O₂), trotz oder nach v.a. anfänglich deutlicher Drosselung, durch erhöhte Expression von microRNA-497, zu einer im Vergleich zur Normoxiegruppe nun sogar vermehrten Proteinexpression kommt, um eine weiter überschießende, unphysiologische Aktivierung des TGF- β -Signalweges zu verhindern.

Zusätzlich zu dieser Hypothese präsentierten sich, in einer anderen Versuchsreihe der vorliegenden Studie, signifikant gesunkene microRNA-497-Expressionslevel in A549-Zellen, die zuvor mit TGF- β stimuliert wurden (Abb.18). Spekulieren kann man nun über die Frage, ob es sich um einen additiven Feedbackmechanismus handelt, sodass *SMURF2* nicht nur den Rezeptor selbst bzw. nachfolgende Signalmoleküle torpediert, sondern reziprok mit der microRNA-497 direkt interagiert oder ihre Expression behindert. Diese Idee der beiderseitigen miRNA-Zielgen-Beeinflussung wurde bereits vorher beschrieben (Pasquinelli 2012) und könnte eventuell sogar den weiteren Verlauf, der in den späteren postnatalen Tagen abfallenden microRNA-497-Expressionslevel, erklären (siehe Abb.6B).

5.4 Disinhibition des TGF- β -Signals durch microRNA-497

In anschließenden Experimenten wurden die Auswirkungen auf den TGF- β -Signalweg untersucht. Signifikant erhöhte Expressionslevel von - dem TGF- β -Signal folgend, zunehmend exprimierten - Molekülen, wie SMAD3, SNAIL und PAI-1 (Abb.14B,C und D), unterstützen die Hypothese der Enthemmung des Signalweges durch die microRNA-497-SMURF2-Interaktion. Die rezeptor-assoziierten Proteine SMAD2 und SMAD3 können einerseits direkt, wie oben beschrieben, durch SMURF2 ubiquitiniert und dem Proteasom zugeführt werden oder ihre rezeptor-induzierte Phosphorylierung wird behindert. Eine, wenn auch nicht signifikante, Tendenz zu steigenden SMAD-Leveln in Anwesenheit von microRNA-497, ist in Abb.15 für SMAD3 auch auf Proteinebene zu erkennen. Der für die Phosphorylierung zuständige T β R-I wird ebenso durch SMURF2 degradiert (Eichhorn 2013). Kavsak und Kollegen konnten verringerte T β R-I Level nachweisen, v.a. in zusätzlicher Anwesenheit von SMAD7. Es gelang ihnen nicht die Ubiquitinierung direkt darzustellen. Mutmaßliche Gründe hierfür sahen sie entweder in einem sehr raschen Abbau des durch Ubiquitin gekennzeichneten Moleküls oder dem, als Bindeglied zwischen SMURF2 und dem Rezeptor agierenden, I-SMAD7, durch dessen Ubiquitinierung der ganze Komplex lysosomal oder proteasomal abgebaut wird (Kavsak 2000). Wie in Abbildung 16A zu sehen wurden in der hier präsentierten Studie, im Vergleich mit Kontrollen, deutlich höhere Proteinlevel des Rezeptors erreicht, wenn A549-Zellen für zwei Tage mit microRNA-497 transfektiert wurden. Im Zusammenhang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen, die eine Beeinflussung von SMURF2 durch eben diese microRNA darlegen, kann eine geringere Rezeptordegradation durch SMURF2 vermutet werden.

Eine insgesamt verminderte Expression von SMAD2 konnte in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden, was übereinstimmt mit den Aussagen anderer Studien, in denen die Gesamtlevel einiger SMAD-Proteine (z.B.1, 2, 4 und 7) nicht durch SMURF2 verändert wurden (Kavsak 2000, Zhang 2001). Lo und Massague konnten 1999 auch durch Inhibition der Proteasomen keine höhere Rate an SMAD2 induzieren, wohingegen aktiviertes, also phosphoryliertes SMAD2 ubiquitiniert und nachfolgend abgebaut wurde. Anmutende Erklärungsansätze beinhalten, dass einerseits p-SMAD2 eventuell ein besseres Substrat zur Ubiquitinierung darstellt oder die durch die Phosphorylierung ermöglichte Anreicherung dessen im Nucleus von entscheidender Bedeutung ist (Lo and Massague 1999, Lin, Liang et al. 2000). Dass die Level von SMURF2 und p-SMAD2 umgekehrt miteinander korrelieren, zeigte ebenfalls Fukuchi 2002 in seiner Studie mit Ösophaguskarzinomzellen (Fukuchi, Fukai et al. 2002). Es ist in aktuell vorliegender Untersuchung gelungen, in mit microRNA-497 transfektierten A549-Epithelien, gesteigerte p-SMAD2-Proteinlevel zu erreichen, was in

zweierlei Hinsicht eine schlüssige Konsequenz im Blick auf die zugehörigen Hypothesen darstellt. Zum Einen bestärkt es die Hypothese, dass durch die microRNA-497 SMURF2 herunterreguliert wird und es schlussendlich zu einem geringeren Abbau an p-SMAD2 kommt, zum Anderen wird ebenfalls der T β R-I nicht durch SMURF2 degradiert, wodurch folglich TGF- β -induziert mehr SMAD2 von diesem phosphoryliert werden kann.

SNAIL ist ein Transkriptionsfaktor, welcher sich, wie bereits zuvor beschrieben und in Abbildung 14C zu sehen, nach der Transfektion von A549-Zellen mit der microRNA-497 stärker anreichert, als er es in der entsprechenden Kontrollgruppe tut. TGF- β -Liganden können allem Anschein nach die Genexpression von SNAIL sowohl durch ihren SMAD-abhängigen, als auch durch SMAD-unabhängige Signalwege anregen (Saika, Kono-Saika et al. 2004, A Jayachandran 2009, Jalali, Zhu et al. 2012). Vermeintlich kann SNAIL ebenfalls umgekehrt die Synthese der Liganden initiieren und hierdurch die Pfade der drei verschiedenen TGF- β -Liganden 1, 2 und 3 verknüpfen (Medici, Hay et al. 2008). Doch nicht nur positiv, sondern auch negativ kann das Zinkfingerprotein die Genexpression beeinflussen. In Zellverbänden unterschiedlichen Ursprungs, wird Snail die Repression von E-Cadherin im Zusammenhang mit veränderten Zelleigenschaften nachgesagt. Beispielsweise in Kolonkarzinomzellen, in Epithelien die sich während der späten Entwicklung an der Gaumenfalz befinden, sowie gleichfalls bei Untersuchungen zur Lungenfibrose in murinen ATII-Zellen und den, auch in dieser Studie verwendeten, humanen A549-Epithelien (Tan, Costello et al. 2001, A Jayachandran 2009, Jalali, Zhu et al. 2012). All diesen verschiedenen Epithelien - mit malignem, embryonalem oder primär physiologischem Ausgangspunkt - ist gemeinsam, dass sie, um ihrer Direktive zu folgen, Migrationsvermögen erlangen müssen. Durch den Vorgang der Epithelialen-Mesenchymalen Transition können zuvor epitheliale Zellen eben genau diese, eigentlich Mesenchymzellen vorbehaltene, Fähigkeit erwerben. Die unter anderem durch E-Cadherin bestehende Verankerung aus dem Zellverband zu lösen, stellt einen der ersten Schritte dar. Weitere Maßnahmen sind das Exprimieren von Proteinen, welche für das Entwickeln mesenchymaler Eigenschaften notwendig sind. Ein Beispiel ist α -SMA, was mutmaßlich auch von einer TGF- β -induzierten SNAIL-Überexpression getriggert wird (A Jayachandran 2009). N-Cadherin, das die Fähigkeit besitzt über Zell-Zell-Kontakte deren Beweglichkeit zu steigern, wird auch durch die Mithilfe von SNAIL hochreguliert (Derycke and Bracke 2004). Zusammenfassend kann womöglich, aufgrund der erwähnten Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit, davon ausgegangen werden, dass es durch die Suppression von SMURF2 mittels microRNA-497 zunächst zu einer vermehrten Aktivierung des TGF- β -Signalweges kommt und dies im Folgenden in eine gesteigerte SNAIL-Expression mündet. Ob hierfür nun der verminderte Abbau des T β R-I und des aktivierten SMAD2 oder doch eher der SMAD-unabhängige Weg, welcher dann ausschließlich durch die enthemmte

Übertragung durch den Rezeptor betroffen wäre, verantwortlich ist, bleibt zunächst ungewiss.

Ein weiteres durch TGF- β induziertes Protein, das aufgrund dessen als Indikator für die Aktivität dieses Signalweges in der vorliegenden Studie genutzt wurde, ist der *plasminogen activator inhibitor-1* (Reilly and McFall 1991, Cao, Hogg et al. 1995). Entsprechend den Aufgaben seines Induktors TGF- β , wird auch PAI-1 z.B. mit dem Umbau und der Erneuerung der Extrazellulärmatrix assoziiert (Kutz, Hordines et al. 2001). Weiterhin führt die Expression von PAI-1 zu gesteigerter und gerichteter Zellbeweglichkeit. Dies ist eine v.a. in der Wundheilung und - wie zuvor erwähnt - in der Tumorentstehung bzw. -ausbreitung essenzielle Zelleigenschaft. Gemeinsam mit einer forcierten PAI-1-Expression konnten in Untersuchungen abermals sinkende Level von epithelialen Markern, wie z.B. E-CADHERIN und anschließend steigende Level von mesenchymalen Markern (N-CADHERIN, α -SMA oder VIMENTIN) nachgewiesen werden (Kutz, Hordines et al. 2001, Freytag, Wilkins-Port et al. 2010). He, Tan et al. identifizierten 2010 in ihrer Arbeit an menschlichen Nierentubulusepithelien, PAI-1 als direktes Ziel des WNT/ β -CATENIN-Signalweges und beschrieben dessen Suppression durch den SMAD-Signalweg. Da dies allerdings teils im Widerspruch zu anderen Studien stand (Dennler, Itoh et al. 1998, Dong, Zhu et al. 2002) und sowieso diverse Verbindungen zwischen den einzelnen TGF- β -Pfaden bestehen (z.B. auch MAPK- und JNK-Signal), äußerten sie die Vermutung, dass die Art wie PAI-1 beeinflusst wird sowohl vom Zelltyp, als auch vom physiologischen oder pathologischen Kontext abhängig zu sein scheint (He, Tan et al. 2010). Passend zu dieser Überlegung konnten in der vorliegenden Studie an A549-Epithelien wiederum gleichzeitig signifikant erhöhte Werte von SMAD3 und PAI-1 gemessen bzw. weiterhin die Phosphorylierung von SMAD2 - wenn auch bei konstanter Gesamtmenge - evaluiert werden. All diese Resultate lassen auf ein, im Vergleich mit Kontrollen, weniger eingeschränktes Signal durch TGF- β schließen, wenn die Zellen zuvor mit der microRNA-497 transfektiert wurden.

5.5 Zellveränderungen nach microRNA-497 bedingter Disinhibition des TGF- β -Signalweges

Vielfach wurde erläutert, dass die Epithelial-Mesenchymale-Transition durch den TGF- β -Signalweg gesteuert werden kann. Wiedermal sowohl SMAD-abhängig als auch -unabhängig (Kalluri and Weinberg 2009). Durch die Mitwirkung hier zuvor teils diskutierter Transkriptionsfaktoren und Enzyme, wie SNAIL, TWIST und PAI-1, verlieren Epithelien ihre typischen Zellkontakte, ihre Polarität, verändern schließlich ihre Morphologie und erlangen fortan eher mesenchymale Attribute (Kasai 2005, Willis and Borok 2007). TWIST reprimiert,

ähnlich wie SNAIL, E-CADHERIN und induziert andererseits N-CADHERIN, FIBROBLASTEN-SPEZIFISCHES-PROTEIN-1 und FIBRONECTIN. Anderweitig regulierte epitheliale Proteine stellen OCCLUDIN und DESMOPLAKIN dar, welche ebenfalls Bestandteile von Zell-Zell-Kontakten sind (Pozharskaya 2009). Gängige Mesenchymmarker sind, neben v.a. N-CADHERIN, gleichermaßen VIMENTIN und α -SMA (Liu, El-Naggar et al. 2008). Dass zur Initiation der EMT auch Umstände wie eine hypoxische Umgebung beitragen können, zeigten Cannito, Novo et al. in ihrer Studie mit karzinomatösen Leber-, Pankreas-, Colon- und Brustdrüsenzellreihen (Cannito, Novo et al. 2008). Abgesehen vom Vorgang der Metastasierung, wurde EMT pathophysiologisch wiederholt mit Fibrose assoziiert. Einige Studien hierzu untersuchten z.B. Erkrankungen der Niere, doch auch in der Lunge ist dies heute ein recht etablierter, akzeptierter Pathomechanismus (Phanish, Wahab et al. 2006, Willis and Borok 2007, Pozharskaya 2009, Chapman 2011). Um den Vorgang nachzuweisen, macht man sich u.a. die entsprechenden Zellmarker zunutze. Es war hier möglich eine signifikante Änderung ausgewählter EMT-Marker auf mRNA-Ebenen zu erzielen, indem man A549 Zellen für 24 Stunden einer erhöhten TGF- β -Konzentration aussetzte (siehe Abb.17). Das eben dieser Mechanismus in Lungen (Kasai 2005) und anderen Geweben (Saika, Kono-Saika et al. 2004, Valcourt, Kowanetz et al. 2005, Phanish, Wahab et al. 2006) über SMAD-Moleküle vermittelt werden kann, wurde schon in anderen Arbeiten eruiert. Gleichwertige Differenzen in den Expressionsleveln von N-CADHERIN und α -SMA, konnten auch bei mit Kontrollen verglichenen microRNA-497 behandelten Zellen festgestellt werden (Abb.19). Obgleich dies für E-CADHERIN leider nicht gelang, lässt sich doch die zuvor ausführlich beschriebene Assoziation von microRNA-497 und dem TGF- β -Signal erahnen, welches nun zu EMT führen kann. Eine doppelte Expression epithelialer wie mesenchymaler Marker, könnte auch erklärt werden, indem man annimmt, dass sich die Zellen in einem Übergangszustand befinden (Kalluri and Weinberg 2009, Lai, Wolkenhauer et al. 2016).

Dass die regulatorischen Aufgaben von microRNAs auch die EMT betreffen, wurde z.B. von Gregory durch Studien an Brustkrebszellen beschrieben. Die microRNA-200-Familie bzw. microRNA-205 reprimieren ZEB-1 - einen Transkriptionsfaktor des TGF- β -Signalweges - und deren Ausfall führt in Mammakarzinomzellen zu EMT-typischen Proteinexpressionsveränderungen (Gregory 2008). MicroRNA-21 hingegen hat einen positiven Effekt auf TGF- β induzierte EMT und auch Fibrose (Zavadil, Haley et al. 2008), genauso wie, ganz zeitnah entdeckt, die microRNA-424. Sie selbst wird durch TGF- β induziert, verringert SMURF2-Proteinlevel (positiver Feedback-Mechanismus) und verursacht schließlich einen Anstieg von α -SMA in A549-Zellen (Xiao, Huang et al. 2015).

Nicht minder aktuell ist die Untersuchung eines BPD-Modells mit neugeborenen Ratten von Yang, welche EMT als einen Pathomechanismus der hier gleichfalls im Mittelpunkt stehen-

den Erkrankung beschreibt (Yang 2014). Wenn auch weniger als vor der standardisierten Surfactantgabe an sehr kleine Frühgeborene, sieht man in der „neuen“ BPD noch immer Fibrosen der Septen. Prägnanter ist allerdings die gestörte Ausbildung der Septen während der Alveolarisierung, so kommt es zur alveolären Hypoplasie (Bland 2005). Um auszusprossen benötigen diese sogenannten sekundären Septen ELASTIN an ihren Spitzen, das durch die Quervernetzung von TROPOELASTIN mit Hilfe von Lysyloxidasen entsteht. TROPOELASTIN seinerseits wird von spezialisierten Fibroblasten, den Myofibroblasten gebildet (Bostrom, Willetts et al. 1996, Bourbon, Boucherat et al. 2005). Sie sind also essentiell für diesen Prozess. Klassischer Weise exprimieren sie α -SMA, was auf die Kontraktilität, eine zweite charakteristische Eigenschaft hindeutet, welche bei der Elongation der Septen hilfreich ist (Phan 2002, Saika, Kono-Saika et al. 2004, Yamada, Kurihara et al. 2005, Chen, Acciani et al. 2012, Yang 2014). Doch eben solche Myofibroblasten können, wenn sie zu viel EZM bilden, fibrotische Veränderungen verursachen (Kuhn and McDonald 1991, Serini and Gabbiani 1999). Nimmt man nun an, was schon mehrfach beschrieben wurde, dass sich Epithelien (speziell AT-II) durch den Einfluss von TGF- β über EMT zu Fibroblasten bzw. schlussendlich zu Myofibroblasten umwandeln (Mattey, Dawes et al. 1997, Yang 2014), sind weitere Verknüpfungen zur gestörten Alveolarisierung wie sie in der BPD vorkommt denkbar. Myofibroblasten haben eine nur eingeschränkte Proliferation (Phan 2002), ganz im Gegensatz zu AT-II-Zellen. Diese stellen gewöhnlich sozusagen das Stammzellreservoir der AT-I-Zellen dar. Um die neu entstehenden Alveolarwände ausreichend mit AT-I-Zellen auszukleiden und die Blut-Luft-Schranke auszubilden, bedarf es also genügend AT-II-Zellen (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Spekuliert wurde das Myofibroblasten proapoptotische Reize auf Alveolarepithelien ausüben (Wang, Ramos et al. 1999). Weiterhin ist die Ausdifferenzierung der Epithelien von Bedeutung, da viele Entwicklungsvorgänge auf der Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym basieren und hierfür spezifische Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren vonnöten sind (Wan, Kaestner et al. 2004). Vorstellbar wäre also eine Verknüpfung dieser Kommunikation mit der gerichteten Migration der Myofibroblasten in die Leisten der Sekundärsepten. Die Ablagerung von z.B. TROPOELASTIN an nicht genau definierten Stellen, scheint negative Auswirkungen auf die Alveolarisierung zu haben. Eine übermäßige, ungeordnete ELASTIN-Absonderung wurde in Modellen für BPD oder anderen chronischen Lungenerkrankungen immer wieder festgestellt (Bland 2005, Nakanishi, Sugiura et al. 2007, Li, Yuan et al. 2012). Neben den vorher geschilderten Änderungen auf mRNA-Ebene, konnte in gleicher Weise die vermehrte Proteinexpression von α -SMA in A549-Zellen dokumentiert werden (Abb.19). In einer Abhandlung von Li wurde das Entstehen von α -SMA-exprimierenden Myofibroblasten aus renalen Tubulusepithelien, über einen ganz ähnlichen Pfad formuliert. Nur war hier, anstelle von

5 Diskussion

SMURF2, die Hemmung von TGF- β durch SMAD7 der umschriebene, begrenzende Faktor des Mechanismus (Li, Zhu et al. 2002).

Durch die Beleuchtung von Expressionsleveln der EMT-Marker N-Cadherin und α -SMA in primären murinen AT-II-Zellen, nach der Transfektion mit microRNA-497 (Abb.21), konnten einige Hypothesen der vorliegenden Studie erneut untermauert werden. Beide Markerproteine waren signifikant in ihrer Expression angeregt, was die Vorstellung einer EMT stützt.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Es war nicht möglich eine schlüssige, schon gar nicht signifikante Interaktion der microRNA-322 und ihrem statistisch vorhergesagten Zielgen *Rarb* - weder *in vitro*, noch *in vivo* - ausfindig zu machen. Für zukünftige Untersuchungen erstrebenswert bleibt es allerdings, weiter zu eruieren, welche Wirkung die, im Mausmodell eindeutig dysregulierte, microRNA-322 auf die späte Lungenentwicklung hat.

Ein Ablaufen des gerade ausführlich vorgestellten Prozesses der Inhibition von SMURF2 durch microRNA-497, welcher eine Enthemmung des TGF- β -Signalweges und eine Umwandlung von Epithelien zu mesenchymalen Zellen (mutmaßlich Myofibroblasten) zur Folge hat, kann angenommen werden. Passend zu den im bronchoalveolären Aspirat von frühgeborenen Patienten auftretenden - sogar mit der Schwere der BPD korrelierenden - erhöhten TGF- β -Werten (Kotecha, Wangoo et al. 1996, Lecart, Cayabyab et al. 2000), stellen die Ergebnisse dieser Arbeit einen möglichen Erklärungsansatz für die ungehemmt starke Auslastung des Signalweges in der Erkrankung dar. Interessant könnte eine weitere Abklärung auch SMAD-unabhängiger Signale in diesem Zusammenhang sein und ob die vermutete reziproke Interaktion von Smurf2 mit microRNA-497 belegt werden kann. Eingliedern lassen sich hier desweiteren Studien, welche ähnliche Aussagen über das Vorkommen und Zutun von Myofibroblasten in der BPD treffen (Popova, Bozyk et al. 2010, Popova, Bozyk et al. 2010, Li, Yuan et al. 2012). Fraglich bleibt, ob das zeitlich begrenzte postnatal-übermäßige Vorkommen der microRNA-497 ausreicht, um klinisch relevante, pathologische Konsequenzen zu provozieren und wenn ja, wie gegen diese vorgegangen werden könnte. Denn Bedarf besteht neben vorbeugenden Maßnahmen, wie z.B. der prophylaktischen Vitamin A-Gabe an Risikopatienten der BPD, natürlich auch an neuen therapeutischen Ansätzen. Da die EMT durch den Vorgang der Mesenchymal-Epithelialen Transition wahrscheinlich reversibel ist (Kalluri and Weinberg 2009) und so einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt darstellt, besteht eben deshalb besonderes Interesse an der weiteren Aufklärung der Relevanz in der Ätiologie der BPD.

Eine Chance microRNAs oder ihre, als Antagomir bezeichneten, Antagonisten als therapeutisches Werkzeug zu nutzen besteht (Sessa and Hata 2013). Dies verlangt aber zunächst weiteren Wissenszuwachs, natürlich im Bereich des Verfahrens der Antagonisierung selbst, aber vor allem grundlegend in den stattfindenden Pathomechanismen.

7 Zusammenfassung

Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine Erkrankung, die bei Frühgeborenen durch lange Atemunterstützung entstehen und teils chronische Schäden zur Folge haben kann. Verbesserte Beatmungsstrategien haben zur Veränderung der Pathophysiologie, jedoch nicht zum Verschwinden der BPD geführt. Die markantesten Veränderungen sind die unausgereiften Gefäßstrukturen und die verringerte Oberfläche der Lunge durch unvollständige Septierung der Alveolensäcke. Um den Kindern in der Zukunft eine noch bessere Versorgung zu gewährleisten, sollte zunächst versucht werden die Genese der BPD immer detaillierter zu verstehen und anschließend präventiv intervenieren zu können oder zumindest Therapieoptionen aufzufinden.

Die in dieser Arbeit erläuterten Untersuchungen haben sich mit zwei, in der BPD bereits zuvor als beteiligt beschriebenen, Signalwegen befasst. Neu war zum Einen die Frage inwieweit Veränderungen in der Dynamik von microRNAs, genauer der microRNA-322 bzw. der microRNA-497, Einfluss auf den Signalweg von für Erstere *retinoic acid*, sowie für microRNA-497 von *transforming growth factor- β* haben. Zum Anderen, welche pathophysiologisch denkbaren, relevanten Entwicklungen diese Mechanismen auf Zellebene schlussendlich hervorrufen. Die jeweilige Genexpression, nach Transfektion und Kultivierung der verschiedenen Zellen, wurde durch quantitative *real time-PCR*, die entsprechenden Proteinlevel mittels *western blotting* beurteilt.

Obwohl als Zielgen der microRNA-322 prognostiziert, konnte *in vitro* die *retinoic acid receptor- β* mRNA nicht als Ziel der microRNA-322 validiert werden. Als Kritik am generellen Versuchsaufbau ist zu sagen, dass es vermutlich Zellreihen gibt, welche besser die Eigenschaften von Lungenfibroblasten widerspiegeln, als die verwendeten NIH-Zellen. Weiterhin konnte *in ex vivo* Lungengewebe des BPD-Modells, keine verminderte Expression von RAR- β entdeckt werden. Folglich ist RAR- β vielleicht kein reales Ziel der microRNA-322.

Beim Zielgen Smurf2, dessen Produkt als Inhibitor des TGF- β -Signalweges wirkt, konnten die Vorhersagen der microRNA-497-induzierten Repression untermauert werden, zumindest sowohl in der Zellreihe A549, als auch in Primärzellen. Im TGF- β -Signalweg wurden schon früher mehrfach sogenannte Feedbackmechanismen vermutet, welche zur Feinregulierung der Aktivierung beitragen. Dies war auch in der vorliegenden Studie eine Überlegung, um die nun verwirrenderweise resultierende Mehrexpression von Smurf2 nach Hyperoxieexposition von Lungenhomogenaten im Mausmodell der BPD zu begründen. Unterstützt wurde die Überlegung durch den in *western blots* begründeten Anhalt, für ebenfalls gesteigerte Rezeptoraktivierung und nachfolgend ausgelöste Phosphorylierung von Überträgerproteinen

7 Zusammenfassung

des Signalweges. Zur Darstellung der, nach mutmaßlicher Enthemmung des TGF- β -Signals, auftretenden Konsequenzen auf Zellebene, wurden Markerproteine der Epithelial-Mesenchymalen Transition betrachtet. Dieser Vorgang kann mit Hilfe von TGF- β eingeleitet werden. Die signifikant sinkende Anzahl des epithelialen Oberflächenmarkers E-Cadherin bzw. die Anreicherung typisch mesenchymaler Proteine, sowohl in der verwendeten Zellreihe A549, als auch in Primärzellen und *in vivo*-Lungen des BPD-Modells, lässt ähnliche Vorgänge annehmen. Zukünftig könnte die Idee der EMT in diesem Modell bestärkt werden, wenn z.B. die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht würde, welche diese durch modifizierte Proteinexpression erlangen müssten.

8 Summary

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a disease in premature babies after a longterm respiratory support and it can cause chronic complications. Improvements in ventilation changed the pathophysiology, but could not erase BPD completely. The most striking changes are the immature vascular system and the reduced surface of the lung, because of incomplete secondary septation in alveolar saccules. To further improve treatments for those children in future, we have to know firstly about the genesis of BPD in more detail and then find ways of prevention, or at least therapeutic options.

The examinations in this study considered two signaling pathways already known in BPD. What is new, is how the change of dynamics of microRNAs, particularly of microRNA-322 and microRNA-497, interfere with the signaling pathways, regarding the first microRNA of retinoic acid and in connection with microRNA-497 of transforming growth factor- β . Moreover what kind of relevant developments these mechanisms finally evoke in the cell. After transfection and cultivation of the different cells, gene expressions were assessed with real time-PCR and corresponding protein levels through western blotting.

Although predicted as a target of microRNA-322, the retinoic acid receptor- β mRNA could not be validated as a microRNA-322 target *in vitro*. As general critique of the experimental setup could be said, that there might be cell lines which better reflect the properties of lung fibroblasts than the applied NIH-cells. Furthermore, *in ex vivo* lung tissue, decreased expression of RAR- β was not detected in experimental BPD. Therefore, RAR- β may not be a true target of microRNA-322.

Regarding target gene Smurf2, its product functions as an inhibitor in TGF- β signaling pathway, the microRNA-497-induced repression was confirmed, at least in cell line A549 and in primary cells. Feedback mechanisms were already assumed more often in TGF- β signaling to contribute in regulating the activation. This was also an idea in the present study to explain the confusingly appearing overexpression of Smurf2, resulting in hyperoxia-exposed lung homogenates in the mouse model of BPD. The idea was supported by indications of yet increased receptor activation and following phosphorylation of downstream proteins shown in western blots. To display consequences of presumed deinhibition of TGF- β signaling concerning the cells, epithelial-mesenchymal transition markers were regarded. This process can be initiated by TGF- β . The significantly decreased number of epithelial surface protein E-cadherin and increase in typically mesenchymal proteins, in A549 cell line, as well as in pri-

8 Summary

mary cells and *in vivo* lung homogenates of BPD-model, suggests a similar process. In the future the concept of EMT in this model could be encouraged, if for example there would be studies about the ability of cell migration, which they should obtain through modified protein expression.

9 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
Δ	<i>Delta</i> - Differenz
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ mol	Mikromol
ACTA2	Genregion/RNA von α -SMA, <i>Homo sapiens</i>
Acta2	Genregion/RNA von α -SMA, <i>Mus musculus</i>
AF-1/2	<i>transcriptional activation function-1/2</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATRA	<i>all-trans retinoic acid</i> - all-trans Retinsäure
ATRAL	<i>all-trans retinaldehyd</i> - all-trans Retinaldehyd
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i> - komplementäre DNA
CPAP	<i>continuous positive airway pressure</i> - kontinuierlich positiver Atemwegsdruck als Atemunterstützung
CRABP	<i>cellular retinoic acid binding protein</i> - zelluläres Retinsäure bindendes Protein
CRBP	<i>cellular retinol binding protein</i> - zelluläres Retinol bindendes Protein
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DBD	DNA-bindende-Domäne
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure

9 Abkürzungsverzeichnis

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	embryonaler Entwicklungstag
EGTA	Ethylenglycol-bisaminoethylether-tetraacetat
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
et al.	<i>et alia</i> - und andere
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS / FCS	<i>fetal bovine serum/ fetal calf serum</i> - Fetales Kälberserum
FGF10	<i>fibroblast growth factor 10</i> - Fibroblastenwachstumsfaktor 10
FSP1	Fibroblasten spezifisches Protein 1
HFO	Hochfrequenzoszillation
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> - Hepatozytenwachstumsfaktor
HMGA2	<i>high mobility group A2</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i> - Mensch
Hyx	Hyperoxie
kDa	Kilodalton
l	Liter
LBD	Liganden-bindende-Domäne
LEF-1	<i>lymphoid enhancer factor-1</i> - lymphoider verstärkender Faktor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mmu	<i>Mus musculus</i> - Hausmaus
mRNA	<i>messenger RNA</i> - Boten-RNA

9 Abkürzungsverzeichnis

n.s.	nicht signifikant
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nox	Normoxie
nt	Nukleotide
Opti-MEM	Serumreduziertes Medium
P	postnataler Tag
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ - Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pre-microRNA	<i>precursor-microRNA</i>
pri-microRNA	<i>primary-microRNA</i>
p-SMAD	<i>phosphorylated-SMAD</i> (ausschließlich phosphorylierte SMAD-Proteine)
RA	<i>retinoic acid</i> - Retinsäure
RARB	<i>retinoic acid receptor-β</i> - Retinsäurerezeptor- β , <i>Homo sapiens</i>
<i>RARB</i>	Genregion/RNA von <i>retinoic acid receptor-β</i> , <i>Homo sapiens</i>
<i>Rarb</i>	Genregion/RNA von <i>retinoic acid receptor-β</i> , <i>Mus musculus</i>
RARE	<i>retinoic acid responsive elements</i> - Retinsäure empfindliches Element
RBP	<i>retinol binding protein</i> - Retinol bindendes Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RXR	<i>retinoid receptor</i> - Retinoidrezeptor

9 Abkürzungsverzeichnis

SARA	<i>small anchor for receptor activation</i>
Scr	<i>scramble</i> - chiffrierte Kontrollsequenzen
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> - Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i> - kleine interferierende RNA
SMAD	<i>small mothers against decapentaplegic, Homo sapiens</i>
SMURF	<i>SMAD ubiquitination regulatory factor, Homo sapiens</i>
<i>SMURF</i>	Genregion/RNA von SMURF, <i>Homo sapiens</i>
<i>Smurf</i>	Genregion/RNA von Smurf, <i>Mus musculus</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
TβR	TGF-β Rezeptor
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i> - transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
t-SMAD	<i>total-SMAD</i> (Gesamtmenge des Proteins)
V	Volt
v.a.	vor allem
ZEB1	<i>transcriptional repressor zinc-finger E-box binding homeobox1</i>

Konvention von Gen- und Proteinsymbolen bei Vertebraten laut *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) :

PROTEINE	für hsa und mmu, Großbuchstaben
<i>GENE</i>	für hsa, kursiv und Großbuchstaben
<i>Gene</i>	für mmu, kursiv

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die vorgeburtliche Lungenentwicklung.....	3
Abbildung 2 BPD-Definition laut NIH	6
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Retinsäure-Signalweg	10
Abbildung 4 Schematische Darstellung des TGF- β -Signalwegs	14
Abbildung 5 MicroRNA-Synthese	20
Abbildung 6 Verlauf der Expressionslevel von microRNA-322 und microRNA-497 an den ersten postnatalen Tagen bei Mäusen des BPD-Modells	38
Abbildung 7 Expression der mRNA von <i>Rarb</i> nach microRNA-322 Transfektion von NIH-Fibroblasten.....	41
Abbildung 8 Unveränderte <i>Rarb</i> -Expression nach Transfektion von NIH-Zellen mit microRNA-322	42
Abbildung 9 Auswirkungen der Transfektion mit microRNA-322 auf das Expressionslevel von <i>Rarb</i> - mRNA in Primärfibroblasten	43
Abbildung 10 <i>Rarb</i> Expressionslevel in Mäusen des BPD-Modells am postnatalen Tag P3.5.....	44
Abbildung 11 Zielgentranskription in A549-Epithelien nach Transfektion mit microRNA-497	45
Abbildung 12 Reduzierte SMURF2- Expression durch microRNA-497 in Zellen der Linie A549.....	46
Abbildung 13 Gesteigerte Smurf2- Proteinlevel in Mäuselungen nach postnataler Hyperoxie	46
Abbildung 14 Relative Expressionslevel der mRNA TGF- β -abhängiger Gene nach microRNA-497-Transfektion von A549-Zellen	48
Abbildung 15 Proteinbiosynthese von total-SMAD3 in epithelialer A549-Zellreihe nach Transfektion mit microRNA-497	49
Abbildung 16 Nach Transfektion von A549-Epithelien mit microRNA-497 kommt es zu T β R-I-Überexpression und vermehrter Phosphorylierung von SMAD2	51
Abbildung 17 Einfluss von TGF- β auf EMT-Marker-Genexpression in A549-Zellen....	52
Abbildung 18 Auswirkung der TGF- β -Stimulation von A549-Zellen auf die Expression von microRNA-497	53
Abbildung 19 Einfluss von microRNA-497 auf EMT-Marker-Expression in A549- Zellen.....	54
Abbildung 20 Expression von α -SMA in microRNA-497 transfizierten Epithelien der Zelllinie A549	55

11 Tabellenverzeichnis

Abbildung 21 Einfluss von microRNA-497 auf EMT-Marker-Genexpression in ATII-Zellen	55
---	----

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Primer für real time-RT-PCR (microRNA)</i>	25
Tabelle 2 <i>Primer für real time-RT-PCR (mRNA)</i>	26
Tabelle 3 Verwendete Antikörper	27
Tabelle 4 Zur Transfektion verwendete microRNA-mimics	28
Tabelle 5 MicroRNAs und ihre prognostizierten Zielgene	40

12 Literaturverzeichnis

Adamson, J. (1997). Development of Lung Structure. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.

Albertine, K. H., M. J. Dahl, L. W. Gonzales, Z. M. Wang, D. Metcalfe, D. M. Hyde, C. G. Plopper, B. C. Starcher, D. P. Carlton and R. D. Bland (2010). "Chronic lung disease in preterm lambs: effect of daily vitamin A treatment on alveolarization." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **299**(1): L59-72.

Alejandre-Alcázar, M. A. K., G.; Reiss,I.; Amarie,O.V.; Marsh,L.M.; Sevilla-Pérez,J.; Wygrecka,M.; Eul,B.; Köbrich,S.; Hesse,M.; Schermuly,R.T.; Seeger,W.; Eickelberg,O.; Morty,R.E. (2007). "Hyperoxia modulates TGF- /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia." American Journal of physiology lung cellular and molecular physiology **292**: 537-549.

Ambalavanan, N., J. E. Tyson, K. A. Kennedy, N. I. Hansen, B. R. Vohr, L. L. Wright and W. A. Carlo (2005). "Vitamin A supplementation for extremely low birth weight infants: outcome at 18 to 22 months." Pediatrics **115**(3): e249-254.

Attisano, L., J. L. Wrana, S. Cheifetz and J. Massague (1992). "Novel activin receptors: Distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors." Cell **68**(1): 97-108.

Bancalari, E., G. E. Abdenour, R. Feller and J. Gannon (1979). "Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation." J Pediatr **95**(5 Pt 2): 819-823.

Bancalari, E. C., N ;Sosenko,I.R.S. (2003). "Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition." Seminars in Neonatology **8**: 63-71.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." cell **116**: 281–297.

Bhatt, A. J., G. S. Pryhuber, H. Huyck, R. H. Watkins, L. A. Metlay and W. M. Maniscalco (2001). "Disrupted Pulmonary Vacuature and Decreased Vascular Endothelial Growth Factor, Flt-1, and TIE-2 in Human Infants Dying with Bronchopulmonary Dysplasia." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **164**: 1971–1980.

Bland, R. D. (2005). "Neonatal chronic lung disease in the post-surfactant era." Biol Neonate **88**(3): 181-191.

Bohnsack, M. T., K. Czapinski and D. Gorlich (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." Rna **10**(2): 185-191.

Borthwick, L. A., S. M. Parker, K. A. Brougham, G. E. Johnson, M. R. Gorowiec, C. Ward, J. L. Lordan, P. A. Corris, J. A. Kirby and A. J. Fisher (2009). "Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation." Thorax **64**(9): 770-777.

- Bostrom, H., K. Willetts, M. Pekny, P. Leveen, P. Lindahl, H. Hedstrand, M. Pekna, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, M. Schalling, M. Nilsson, S. Kurland, J. Tornell, J. K. Heath and C. Betsholtz (1996). "PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis." Cell **85**(6): 863-873.
- Bourbon, J., O. Boucherat, B. Chailley-Heu and C. Delacourt (2005). "Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia." Pediatr Res **57**(5 Pt 2): 38r-46r.
- Burk, U. S., J.; Wellner, U.; Schmalhofer, O.; Vincan, E.; Spaderna, S.; Brabletz, T. (2008). "A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells." EMBO reports **9**(6): 582-589.
- Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA **10**(12): 1957-1966.
- Cannito, S., E. Novo, A. Compagnone, L. Valfre di Bonzo, C. Busletta, E. Zamara, C. Paternostro, D. Povero, A. Bandino, F. Bozzo, C. Cravanzola, V. Bravoco, S. Colombatto and M. Parola (2008). "Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells." Carcinogenesis **29**(12): 2267-2278.
- Cao, H. J., M. G. Hogg, L. J. Martino and T. J. Smith (1995). "Transforming growth factor-beta induces plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human orbital fibroblasts." Investigative Ophthalmology & Visual Science **36**(7): 1411-1419.
- Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." Faseb j **10**(9): 940-954.
- Chapman, H. A. (2011). "Epithelial-Mesenchymal Interactions in Pulmonary Fibrosis." Annual review of physiology **73**: 413-435.
- Cheifetz, S., J. A. Weatherbee, M. L. Tsang, J. K. Anderson, J. E. Mole, R. Lucas and J. Massague (1987). "The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors." Cell **48**(3): 409-415.
- Chen, F., Y. Cao, J. Qian, F. Shao, K. Niederreither and W. V. Cardoso (2010). "A retinoic acid-dependent network in the foregut controls formation of the mouse lung primordium." The Journal of Clinical Investigation **120**(6): 2040-2048.
- Chen, F., T. J. Desai, J. Qian, K. Niederreither, J. Lu and W. V. Cardoso (2007). "Inhibition of Tgf beta signaling by endogenous retinoic acid is essential for primary lung bud induction." Development **134**(16): 2969-2979.
- Chen, H., J. Sun, S. Buckley, C. Chen, D. Warburton, X. F. Wang and W. Shi (2005). "Abnormal mouse lung alveolarization caused by Smad3 deficiency is a developmental antecedent of centrilobular emphysema." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(4): L683-691.
- Chen, K. R., N. (2007). "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs." Nature Reviews Genetics **7**: 93-103.
- Chen, L., T. Acciani, T. Le Cras, C. Lutzko and A.-K. T. Perl (2012). "Dynamic Regulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Expression in Alveolar Fibroblasts during Realveolarization." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **47**(4): 517-527.

- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura and R. Shiekhattar (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature **436**(7051): 740-744.
- Cho, S. J., C. L. S. George, J. M. Snyder and M. J. Acarregui (2005). "Retinoic Acid and Erythropoietin Maintain Alveolar Development in Mice Treated with an Angiogenesis Inhibitor." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **33**(6): 622-628.
- Coalson, J. J. (2006). "Pathology of Bronchopulmonary Dysplasia." Seminars in perinatology **30**(4): 179–184.
- Davis, R. P. and G. B. Mychaliska (2013). "Neonatal pulmonary physiology." Seminars in Pediatric Surgery **22**: 179–184.
- De Paepe, M. E., Q. Mao, J. Powell, S. E. Rubin, P. DeKoninck, N. Appel, M. Dixon and F. Gundogan (2006). "Growth of Pulmonary Microvasculature in Ventilated Preterm Infants." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **173**: 204–211.
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-235.
- Dennler, S., S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet and J. M. Gauthier (1998). "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." Embo j **17**(11): 3091-3100.
- Derycke, L. D. and M. E. Bracke (2004). "N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling." Int J Dev Biol **48**(5-6): 463-476.
- Desai, T. J., F. Chen, J. Lu, J. Qian, K. Niederreither, P. Dolle, P. Chambon and W. V. Cardoso (2006). "Distinct roles for retinoic acid receptors alpha and beta in early lung morphogenesis." Dev Biol **291**(1): 12-24.
- Dickman, E. D., C. Thaller and S. M. Smith (1997). "Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects." Development **124**(16): 3111-3121.
- Dong, C., S. Zhu, T. Wang, W. Yoon and P. J. Goldschmidt-Clermont (2002). "Upregulation of PAI-1 is mediated through TGF-beta/Smad pathway in transplant arteriopathy." J Heart Lung Transplant **21**(9): 999-1008.
- Dowling, J. E. and G. Wald (1960). "The role of vitamin A acid." Vitam Horm **18**: 515-541.
- Duester, G. (2000). "Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function." European Journal of Biochemistry **267**(14): 4315-4324.
- Durand, B., M. Saunders, P. Leroy, M. Leid and P. Chambon (1992). "All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs." Cell **71**(1): 73-85.
- Dweep, H., C. Sticht, P. Pandey and N. Gretz (2011). "miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes." J Biomed Inform **44**(5): 839-847.
- Ebisawa, T., M. Fukuchi, G. Murakami, T. Chiba, K. Tanaka, T. Imamura and K. Miyazono (2001). "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation." J Biol Chem **276**(16): 12477-12480.

Eichhorn, P. I., P.V. (2013). "(DE) -Ubiquitination in The TGF- β Pathway." Journal of Cancer Research and Therapeutic Oncology **1**: 1-6.

embryology.ch.(25.8.15).<http://www.embryology.ch/allemand/rrespiratory/phasen07.html>."

Foster, K. A., C. G. Oster, M. M. Mayer, M. L. Avery and K. L. Audus (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism." Exp Cell Res **243**(2): 359-366.

Frenz, D. A. and W. Liu (2000). "Treatment with all-trans-retinoic acid decreases levels of endogenous TGF-beta(1) in the mesenchyme of the developing mouse inner ear." Teratology **61**(4): 297-304.

Freytag, J., C. E. Wilkins-Port, C. E. Higgins, S. P. Higgins, R. Samarakoon and P. J. Higgins (2010). "PAI-1 Mediates the TGF-[beta]1+EGF-Induced [ldquo]Scatter[rdquo] Response in Transformed Human Keratinocytes." J Invest Dermatol **130**(9): 2179-2190.

Fukuchi, M., Y. Fukai, N. Masuda, T. Miyazaki, M. Nakajima, M. Sohda, R. Manda, K. Tsukada, H. Kato and H. Kuwano (2002). "High-Level Expression of the Smad Ubiquitin Ligase Smurf2 Correlates with Poor Prognosis in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma." Cancer Research **62**(24): 7162-7165.

Gauldie, J., T. Galt, P. Bonniaud, C. Robbins, M. Kelly and D. Warburton (2003). "Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia." Am J Pathol **163**(6): 2575-2584.

Gavrilova, R., N. Babovic, A. Lteif, B. Eidem, S. Kirmani, T. Olson and D. Babovic-Vuksanovic (2009). "Vitamin A deficiency in an infant with PAGOD syndrome." Am J Med Genet A **149a**(10): 2241-2247.

genomejet.jp.(14.8.15)."http://genomejet.jp/english/wp-content/uploads/2011/11/rna_1en1.jpg."

Gentry, L. E., N. R. Webb, G. J. Lim, A. M. Brunner, J. E. Ranchalis, D. R. Twardzik, M. N. Lioubin, H. Marquardt and A. F. Purchio (1987). "Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells." Mol Cell Biol **7**(10): 3418-3427.

gnpi.de."http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-014_S2_Praevention_und_Therapie_der_br onchopulmonalen_Dysplasie_Fruehgeborener_06-2009_06-2014.pdf."

Goldin, G. V. and N. K. Wessells (1979). "Mammalian lung development: the possible role of cell proliferation in the formation of supernumerary tracheal buds and in branching morphogenesis." Journal of Experimental Zoology **208**(3): 337-346.

- Golzio, C., J. Martinovic-Bouriel, S. Thomas, S. Mougou-Zrelli, B. Grattagliano-Bessi res, M. Bonni re, S. Delahaye, A. Munnich, F. Encha-Razavi, S. Lyonnet, M. Vekemans, T. Atti -Bitach and Heather C. Etchevers (2007). "Matthew-Wood Syndrome Is Caused by Truncating Mutations in the Retinol-Binding Protein Receptor Gene STRA6." American Journal of Human Genetics **80**(6): 1179-1187.
- Graff, J. M., A. Bansal and D. A. Melton (1996). "Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily." Cell **85**(4): 479-487.
- Gregory, P. A. B., A.G.; Paterson, E.L.; Barry, S.C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M.A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G.J. (2008). "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1." Nature Cell Biology **10**(593-601).
- Gui, T., Y. Sun, A. Shimokado and Y. Muragaki (2012). "The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition." Journal of Signal Transduction **2012**.
- Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-840.
- Hadchouel, A., M.-L. Franco-Montoya and C. Delacourt (2014). "Altered Lung Development in Bronchopulmonary Dysplasia." Birth Defects Research **100**(3): 158–167.
- Han, J., Y. Lee, K.-H. Yeom, Y.-K. Kim, H. Jin and V. N. Kim (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." Genes & Development **18**(24): 3016-3027.
- Have-Opbroek, A. A. W. T. (1991). "Lung Development in the Mouse Embryo." Experimental Lung Research **17**: 111–130.
- Hay, E. D. (2005). "The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it." Developmental Dynamics **233**(3): 706-720.
- He, L. H., G.J. (2004). "MicroRNAs: SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION." Nature Reviews Genetics **5**: 522-531.
- He, W., R. Tan, C. Dai, Y. Li, D. Wang, S. Hao, M. Kahn and Y. Liu (2010). "Plasminogen activator inhibitor-1 is a transcriptional target of the canonical pathway of Wnt/ β -catenin signaling." Journal of Biological Chemistry.
- Higashimoto, Y., M. Ohata, Y. Yamagata, T. Iwata, M. Masuda, T. Ishiguchi, M. Okada, H. Satoh and H. Itoh (2005). "Effect of the adenovirus E1A gene on nitric oxide production in alveolar epithelial cells." Clinical Microbiology and Infection **11**(8): 644-650.
- Hind, M., J. Corcoran and M. Maden (2002). "Temporal/spatial expression of retinoid binding proteins and RAR isoforms in the postnatal lung." American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology **282**(3): L468-L476.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-2060.
- Inman, G. J., F. J. Nicol s and C. S. Hill (2002). "Nucleocytoplasmic Shuttling of Smads 2, 3, and 4 Permits Sensing of TGF- β Receptor Activity." Molecular Cell **10**(2): 283-294.
- Iwano, M., D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada and E. G. Neilson (2002). "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis." J Clin Invest **110**(3): 341-350.

- Jalali, A., X. Zhu, C. Liu and A. Nawshad (2012). "Induction of palate epithelial mesenchymal transition (EMT) by Transforming Growth Factor β (TGF) 3 signaling." Development, growth & differentiation **54**(6): 633-648.
- Jayachandran, A.; Königshoff, M.; Yu, H.; Rupniewska, E.; Hecker, M.; Klepetko, W.; Seeger, W.; Eickelberg, O. (2009). "SNAIL transcription factors mediate epithelial– mesenchymal transition in lung fibrosis." Thorax **64**: 1053-1061.
- Jobe, A. H. and E. Bancalari (2001). "Bronchopulmonary Dysplasia." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **163**(7): 1723-1729.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." The Journal of Clinical Investigation **119**(6): 1420-1428.
- Kam, R. K. T., Y. Deng, Y. Chen and H. Zhao (2012). "Retinoic acid synthesis and functions in early embryonic development." Cell & Bioscience **2**: 11-11.
- Kasai, H. A., J.T.; Mason, R.M.; Kamimura, T.; Zhang, Z. (2005). "TGF- β I induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT)." Respiratory Research **6**(56).
- Kavsak, P. R., R.K.; Causing, C.G.; Bonni, S.; Zhu, H.; Thomsen, G.H.; Wrana, J.L. (2000). "Smad7 Binds to Smurf2 to Form an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the TGF β Receptor for Degradation." Molecular Cell **6**: 1365-1375.
- Khalil, N., O. Berezney, M. Sporn and A. H. Greenberg (1989). "Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation." The Journal of Experimental Medicine **170**(3): 727-737.
- Kim, K., Z. Lu and E. D. Hay (2002). "Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT." Cell Biol Int **26**(5): 463-476.
- Kim, V. N. (2005). "MicroRNA BIOGENESIS: COORDINATED CROPPING AND DICING." Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**: 376-385.
- Kim, V. N. N., J.-W. (2006). "Genomics of microRNA." TRENDS in Genetics **22**(3): 165-173.
- Kitaoka, H., P. H. Burri and E. R. Weibel (1996). "Development of the Human Fetal Airway Tree: Analysis of the Numerical Density of Airway Endtips." The Anatomical Record **244**: 207–213.
- Klingenberg, C., N. D. Embleton, S. E. Jacobs, L. A. F. O'Connell and C. A. Kuschel (2011). "Enteral feeding practices in very preterm infants: an international survey." Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition.
- Königshoff, M., M. Kramer, N. Balsara, J. Wilhelm, O. V. Amarie, A. Jahn, F. Rose, L. Fink, W. Seeger, L. Schaefer, A. Gunther and O. Eickelberg (2009). "WNT1-inducible signaling protein-1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis." J Clin Invest **119**(4): 772-787.
- Kool, H., D. Mous, D. Tibboel, A. d. Klein and R. J. Rottier (2014). "Pulmonary Vascular Development Goes Awry in Congenital Lung Abnormalities." Birth Defects Research (Part C) **102**(4): 343–358.
- Kotecha, S., A. Wangoo, M. Silverman and R. J. Shaw (1996). "Increase in the concentration of transforming growth factor beta-1 in bronchoalveolar lavage fluid before development of chronic lung disease of prematurity." J Pediatr **128**(4): 464-469.

- Kretschmar, M., J. Doody and J. Massague (1997). "Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1." Nature **389**(6651): 618-622.
- Kretschmar, M., F. Liu, A. Hata, J. Doody and J. Massague (1997). "The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase." Genes Dev **11**(8): 984-995.
- Kuhn, C. and J. A. McDonald (1991). "The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis." The American Journal of Pathology **138**(5): 1257-1265.
- Kutz, S. M., J. Hordines, P. J. McKeown-Longo and P. J. Higgins (2001). "TGF-beta1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion." J Cell Sci **114**(Pt 21): 3905-3914.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel and T. Tuschl (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol **12**(9): 735-739.
- Lai, X., O. Wolkenhauer and J. Vera (2016). "Understanding microRNA-mediated gene regulatory networks through mathematical modelling." Nucleic Acids Research.
- Landry, J. S. C., T.; Lands, L.; Menzies, D. (2011). "Long-term impact of bronchopulmonary dysplasia on pulmonary function." Canadian Respiratory Journal **18**(5): 265-270.
- Latini, G., C. De Felice, G. Presta, E. Rosati and P. Vacca (2003). "Minimal handling and bronchopulmonary dysplasia in extremely low-birth-weight infants." European Journal of Pediatrics **162**(4): 227-229.
- Lau, N. C. L. L. P. W., E.G.; Bartel, D.P. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**: 858-862.
- Lecart, C., R. Cayabyab, S. Buckley, J. Morrison, K. Y. Kwong, D. Warburton, R. Ramanathan, C. A. Jones and P. Minoo (2000). "Bioactive transforming growth factor-beta in the lungs of extremely low birthweight neonates predicts the need for home oxygen supplementation." Biol Neonate **77**(4): 217-223.
- Lee, J. H. W., X.H.; Song, J.; Kang, J.J.; Chung, W.-S.; Lee, E.H.; Kim, E.K. (2002). "TGF-beta-induced apoptosis and reduction of Bcl-2 in human lens epithelial cells in vitro." Current Eye Research **25**(3): 147-153.
- Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." The Journal of Cell Biology **172**(7): 973-981.
- Lee, R. C. F., R.L.; Ambros, V. (1993). "The *C.elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementary to *lin-14*." Cell **75**: 843-854.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." The EMBO Journal **23**(20): 4051-4060.
- Lee, Y. J., K.; Lee, J.; Kim, S.; Kim, V.N. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." The EMBO Journal **21**(17): 4663-4670.
- Leid, M., P. Kastner and P. Chambon (1992). "Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways." Trends Biochem Sci **17**(10): 427-433.

- Li, H., X. Yuan, J. Tang and Y. Zhang (2012). "Lipopolysaccharide disrupts the directional persistence of alveolar myofibroblast migration through EGF receptor." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(6): L569-579.
- Li, J. H., H. J. Zhu, X. R. Huang, K. N. Lai, R. J. Johnson and H. Y. Lan (2002). "Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation." J Am Soc Nephrol **13**(6): 1464-1472.
- Li, Y., J. Yang, C. Dai, C. Wu and Y. Liu (2003). "Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis." J Clin Invest **112**(4): 503-516.
- Lim, L. P., N. C. Lau, E. G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M. W. Rhoades, C. B. Burge and D. P. Bartel (2003). "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev **17**(8): 991-1008.
- Lin, X., M. Liang and X. H. Feng (2000). "Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling." J Biol Chem **275**(47): 36818-36822.
- Liu, F., A. Hata, J. C. Baker, J. Doody, J. Carcamo, R. M. Harland and J. Massague (1996). "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator." Nature **381**(6583): 620-623.
- Liu, F., C. Pouponnot and J. Massague (1997). "Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes." Genes Dev **11**(23): 3157-3167.
- Liu, G., A. Friggeri, Y. Yang, J. Milosevic, Q. Ding, V. J. Thannickal, N. Kaminski and E. Abraham (2010). "miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis." The Journal of Experimental Medicine **207**(8): 1589-1597.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor and G. J. Hannon (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science **305**(5689): 1437-1441.

- Liu, X., H. Zhang, L. Gao, Y. Yin, X. Pan, Z. Li, N. Li, H. Li and Z. Yu (2014). "Negative Interplay of Retinoic Acid and TGF- β Signaling Mediated by TG-Interacting Factor to Modulate Mouse Embryonic Palate Mesenchymal-Cell Proliferation." Birth Defects Research (Part B) **00**: 1–7.
- Liu, Y., S. El-Naggar, D. S. Darling, Y. Higashi and D. C. Dean (2008). "ZEB1 Links Epithelial-Mesenchymal Transition and Cellular Senescence." Development (Cambridge, England) **135**(3): 579-588.
- Lo, R. S. and J. Massague (1999). "Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2." Nat Cell Biol **1**(8): 472-478.
- Londhe, V. A., T. M. Maisonet, B. Lopez, B. C. Shin, J. Huynh and S. U. Devaskar (2013). "Retinoic acid rescues alveolar hypoplasia in the calorie-restricted developing rat lung." Am J Respir Cell Mol Biol **48**(2): 179-187.
- Maden, M. and M. Hind (2004). "Retinoic acid in alveolar development, maintenance and regeneration." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **359**(1445): 799-808.
- Malpel, S., C. Mendelsohn and W. V. Cardoso (2000). "Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis." Development **127**(14): 3057-3067.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
- Mark, M., N. B. Ghyselinck and P. Chambon (2006). "Function of retinoid nuclear receptors: lessons from the genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis." Annual review of pharmacology and toxicology **46**: 451–480.
- Massagué, J. (1998). "TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION." Annual review of biochemistry **67**: 753-791.
- Massaro, G. D., D. Massaro, W. Y. Chan, L. B. Clerch, N. Ghyselinck, P. Chambon and R. A. Chandraratna (2000). "Retinoic acid receptor-beta: an endogenous inhibitor of the perinatal formation of pulmonary alveoli." Physiol Genomics **4**(1): 51-57.
- Mata, N. L., W. N. Moghrabi, J. S. Lee, T. V. Bui, R. A. Radu, J. Horwitz and G. H. Travis (2004). "Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells." J Biol Chem **279**(1): 635-643.
- Mathews, L. S. and W. W. Vale (1991). "Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase." Cell **65**(6): 973-982.
- Mattey, D. L., P. T. Dawes, N. B. Nixon and H. Slater (1997). "Transforming growth factor β 1 and interleukin 4 induced α smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor." Annals of the Rheumatic Diseases **56**(7): 426-431.
- McGowan, S., S. K. Jackson, M. Jenkins-Moore, H.-H. Dai, P. Chambon and J. M. Snyder (2000). "Mice Bearing Deletions of Retinoic Acid Receptors Demonstrate Reduced Lung Elastin and Alveolar Numbers." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **23**(2): 162-167.

- Medici, D., E. D. Hay and D. A. Goodenough (2006). "Cooperation between Snail and LEF-1 Transcription Factors Is Essential for TGF- β 1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition." Molecular Biology of the Cell **17**(4): 1871-1879.
- Medici, D., E. D. Hay and B. R. Olsen (2008). "Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through β -Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor- β 3." Molecular Biology of the Cell **19**(11): 4875-4887.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell **15**(2): 185-197.
- Mendelsohn, C., D. Lohnes, D. Decimo, T. Lufkin, M. LeMeur, P. Chambon and M. Mark (1994). "Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants." Development **120**(10): 2749-2771.
- Mendelson, C. R. (2000). Role of transcription factors in fetal lung development and surfactant protein gene expression. Annual review of physiology. **62**: 875-915.
- Minoo, P. and R. J. King (1994). "EPITHELIAL-MESENCHYMAL INTERACTIONS IN LUNG DEVELOPMENT." Annual review of physiology **56**: 13-45.
- Miranda, K. C., T. Huynh, Y. Tay, Y. S. Ang, W. L. Tam, A. M. Thomson, B. Lim and I. Rigoutsos (2006). "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes." Cell **126**(6): 1203-1217.
- Miyazono, K. (2000). "Positive and negative regulation of TGF-beta signaling." J Cell Sci **113** (Pt 7): 1101-1109.
- Miyazono, K., H. Ichijo and C. H. Heldin (1993). "Transforming growth factor-beta: latent forms, binding proteins and receptors." Growth Factors **8**(1): 11-22.
- Murdoch, D. R. and B. A. Darlow (1984). "Handling during neonatal intensive care." Archives of Disease in Childhood **59**(10): 957-961.
- Nagpal, S., S. Friant, H. Nakshatri and P. Chambon (1993). "RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo." The EMBO Journal **12**(6): 2349-2360.
- Nakanishi, H., T. Sugiura, J. B. Streisand, S. M. Lonning and J. D. Roberts, Jr. (2007). "TGF-beta-neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L151-161.
- Nakao, A., M. Afrakhte, A. Moren, T. Nakayama, J. L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N. E. Heldin, C. H. Heldin and P. ten Dijke (1997). "Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling." Nature **389**(6651): 631-635.
- Newgreen, D. and S. McKeown (2005). The Neural Crest. Rise and Fall of Epithelial Phenotype, Springer US: 29-39.
- Niederreither, K., V. Subbarayan, P. Dolle and P. Chambon (1999). "Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development." Nat Genet **21**(4): 444-448.

- Northway, W. H. J., MD; Moss, R.D., MD; Carlisle, K.B., R.P.F.T.; Parker, B.R., MD; Popp, R.L., MD; Pitlick, P.T., MD; Eichler, I., MD; Lamm, R.L., B.S.; Brown, B.W. Jr., PhD (1990). "Late Pulmonary Sequelae of Bronchopulmonary Dysplasia." New England Journal of Medicine **323**(26): 1793-1799.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (1999). "The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation." Developmental Biology **216**(2): 671-680.
- Pasquinelli, A. E. (2012). "MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship." Nat Rev Genet **13**(4): 271-282.
- Penzes, P. and J. L. Napoli (1999). "Holo-cellular retinol-binding protein: distinction of ligand-binding affinity from efficiency as substrate in retinal biosynthesis." Biochemistry **38**(7): 2088-2093.
- Phan, S. H. (2002). "The myofibroblast in pulmonary fibrosis*." Chest **122**(6_suppl): 286S-289S.
- Phanish, M. K., N. A. Wahab, P. Colville-Nash, B. M. Hendry and M. E. Dockrell (2006). "The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGF-beta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells." Biochem J **393**(Pt 2): 601-607.
- Popova, A. P., P. D. Bozyk, J. K. Bentley, M. J. Linn, A. M. Goldsmith, R. E. Schumacher, G. M. Weiner, A. G. Filbrun and M. B. Hershenson (2010). "Isolation of tracheal aspirate mesenchymal stromal cells predicts bronchopulmonary dysplasia." Pediatrics **126**(5): e1127-1133.
- Popova, A. P., P. D. Bozyk, A. M. Goldsmith, M. J. Linn, J. Lei, J. K. Bentley and M. B. Hershenson (2010). "Autocrine production of TGF-beta1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(6): L735-743.
- Pozharskaya, V. T.-G., E.; Rojas, M.; Gal, A.; Amin, M.; Dollard, S.; Roman, J.; Stecenko, A.A.; Mora, A.L. (2009). "Twist: A Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition in Lung Fibrosis" PLoS ONE **4**(10): e7559.
- Reilly, C. F. and R. C. McFall (1991). "Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta regulate plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **266**(15): 9419-9427.
- Roberts, A. B. and M. B. Sporn (1993). "Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta)." Growth Factors **8**(1): 1-9.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst and A. Bradley (2004). "Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units." Genome Research **14**(10a): 1902-1910.
- Runyan, C. E., T. Hayashida, S. Hubchak, J. F. Curley and H. W. Schnaper (2009). "Role of SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) in Maintenance of Epithelial Cell Phenotype." Journal of Biological Chemistry **284**(37): 25181-25189.

- Saika, S., S. Kono-Saika, Y. Ohnishi, M. Sato, Y. Muragaki, A. Ooshima, K. C. Flanders, J. Yoo, M. Anzano, C. Y. Liu, W. W. Kao and A. B. Roberts (2004). "Smad3 signaling is required for epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium after injury." Am J Pathol **164**(2): 651-663.
- Sakai, Y., T. Luo, P. McCaffery, H. Hamada and U. C. Dräger (2004). "CYP26A1 and CYP26C1 cooperate in degrading retinoic acid within the equatorial retina during later eye development." Developmental Biology **276**(1): 143-157.
- Schittny, J. C., S. I. Mund and M. Stampanoni (2008). Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization.
- Schultz, C. J., E. Torres, C. Londos and J. S. Torday (2002). Role of adipocyte differentiation-related protein in surfactant phospholipid synthesis by type II cells.
- Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
- Serini, G. and G. Gabbiani (1999). "Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation." Exp Cell Res **250**(2): 273-283.
- Sessa, R. and A. Hata (2013). "Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases." Pulmonary Circulation **3**(2): 315–328.
- Sessler, R. J. and N. Noy (2005). "A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II." Mol Cell **18**(3): 343-353.
- Shannon, J. M. and B. A. Hyatt (2004). "Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung." Annu Rev Physiol **66**: 625-645.
- Shenefelt, R. E. (1972). "Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment." Teratology **5**(1): 103-118.
- Shennan, A. T., Dunn, M.S., Ohlsson, A., Lennox, K., and Hoskins, E.M. (1988). "Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period." Pediatrics **82**: 527-532.
- Shi, Y. M., J. (2003). "Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus." Cell **113**: 685-700.
- Sluncheva, B. (2010). "[Strategies for nutrition of the preterm infant with low and very low birth weight]." Akush Ginekol (Sofia) **49**(2): 33-39.
- Small, E. M., R. J. A. Frost and E. N. Olson (2010). "MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease." Circulation **121**(8): 1022-1032.
- Strutz, F., M. Zeisberg, F. N. Ziyadeh, C. Q. Yang, R. Kalluri, G. A. Muller and E. G. Neilson (2002). "Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation." Kidney Int **61**(5): 1714-1728.
- Takeuchi, H., A. Yokota, Y. Ohoka and M. Iwata (2011). "Cyp26b1 regulates retinoic acid-dependent signals in T cells and its expression is inhibited by transforming growth factor-beta." PLoS One **6**(1): e16089.

- Tan, C., P. Costello, J. Sanghera, D. Dominguez, J. Baulida, A. G. de Herreros and S. Dedhar (2001). "Inhibition of integrin linked kinase (ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC-/- human colon carcinoma cells." Oncogene **20**(1): 133-140.
- Tang, L. Y., M. Yamashita, N. P. Coussens, Y. Tang, X. Wang, C. Li, C. X. Deng, S. Y. Cheng and Y. E. Zhang (2011). "Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF-beta signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3." Embo j **30**(23): 4777-4789.
- targetscan.org. (23.8.15). "http://www.targetscan.org/mmu_61/."
- ten Dijke, P. H., C.S. (2004). "New insights into TGF-b–Smad signalling." TRENDS in Biochemical Sciences **29**(5): 265-273.
- Thomas, W. and C. P. Speer (2005). "Bronchopulmonale Dysplasie Frühgeborener: Epidemiologie, Pathogenese und Therapie." Monatsschrift Kinderheilkunde **153**: 211–219.
- Thomson, M. A., B. A. Yoder, V. T. Winter, H. Martin, D. Catland, T. M. Siler-Khodr and J. J. Coalson (2004). "Treatment of Immature Baboons for 28 Days with Early Nasal Continuous Positive Airway Pressure." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **169**(9): 1054-1062.
- Thuault, S. V., U.; Petersen, M.; Manfioletti, G.; Heldin, C.-H.; Moustakas, A. (2006). "Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial–mesenchymal transition" The Journal of Cell Biology **174**(2): 175-183.
- Topper, J. N., J. Cai, Y. Qiu, K. R. Anderson, Y. Y. Xu, J. D. Deeds, R. Feeley, C. J. Gimeno, E. A. Woolf, O. Tayber, G. G. Mays, B. A. Sampson, F. J. Schoen, M. A. Gimbrone, Jr. and D. Falb (1997). "Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9314-9319.
- Tyson, J. E., L. L. Wright, W. Oh, K. A. Kennedy, L. Mele, R. A. Ehrenkranz, B. J. Stoll, J. A. Lemons, D. K. Stevenson, C. R. Bauer, S. B. Korones and A. A. Fanaroff (1999). "Vitamin A supplementation for extremely-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network." N Engl J Med **340**(25): 1962-1968.
- Valcourt, U., M. Kowanetz, H. Niimi, C. H. Heldin and A. Moustakas (2005). "TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition." Mol Biol Cell **16**(4): 1987-2002.
- Veness-Meehan, K. A., R. A. Pierce, B. M. Moats-Staats and A. D. Stiles (2002). "Retinoic acid attenuates O₂-induced inhibition of lung septation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(5): L971-980.
- Vicencio, A. G., C. G. Lee, S. J. Cho, O. Eickelberg, Y. Chuu, G. G. Haddad and J. A. Elias (2004). "Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia?" Am J Respir Cell Mol Biol **31**(6): 650-656.
- Vicovac, L. and J. D. Aplin (1996). "Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation." Acta Anat (Basel) **156**(3): 202-216.
- Wan, H., K. H. Kaestner, S. L. Ang, M. Ikegami, F. D. Finkelman, M. T. Stahlman, P. C. Fulkerson, M. E. Rothenberg and J. A. Whitsett (2004). "Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia." Development **131**(4): 953-964.

- Wang, R., C. Ramos, I. Joshi, A. Zagariya, A. Pardo, M. Selman and B. D. Uhal (1999). "Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides." Am J Physiol **277**(6 Pt 1): L1158-1164.
- Wang, T., B. Y. Li, P. D. Danielson, P. C. Shah, S. Rockwell, R. J. Lechleider, J. Martin, T. Manganaro and P. K. Donahoe (1996). "The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors." Cell **86**(3): 435-444.
- Wang, X. F., H. Y. Lin, E. Ng-Eaton, J. Downward, H. F. Lodish and R. A. Weinberg (1991). "Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor." Cell **67**(4): 797-805.
- Wegner, K., A. Bachmann, J. U. Schad, P. Lucarelli, S. Sahle, P. Nickel, C. Meyer, U. Klingmüller, S. Dooley, U. Kummer and (2012). "Dynamics and feedback loops in the transforming growth factor β signaling pathway.." Biophysical Chemistry **162**: 22-34.
- Welty, S. E. (2001). "Is there a role for antioxidant therapy in bronchopulmonary dysplasia?" J Nutr **131**(3): 947s-950s.
- Wert, S. (2004). "Normal and abnormal structural development of the lung." Fetal and neonatal physiology, 3rd edn. WB Saunders Co., Philadelphia, PA: 783-793.
- Wienholds, E. P., R.H.A. (2005). "MicroRNA function in animal development." FEBS Letters **579**: 5911-5922.
- Wiesner, S., A. A. Ogunjimi, H. R. Wang, D. Rotin, F. Sicheri, J. L. Wrana and J. D. Forman-Kay (2007). "Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain." Cell **130**(4): 651-662.
- wikipedia.org.(14.08.15)."https://de.wikipedia.org/wiki/Kernrezeptor#/media/File:Type_ii_nuclear_receptor_action.png."
- Willis, B. C. and Z. Borok (2007). TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease.
- Wilson, A. C. (2010). "What does imaging the chest tell us about bronchopulmonary dysplasia?" Paediatric Respiratory Reviews **11**: 158-161.
- Wong, N. and X. Wang (2015). "miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations." Nucleic Acids Research **43**(D1): D146-D152.
- Wongtrakool, C., S. Malpel, J. Gorenstein, J. Sedita, M. I. Ramirez, T. M. Underhill and W. V. Cardoso (2003). "Down-regulation of retinoic acid receptor alpha signaling is required for sacculation and type I cell formation in the developing lung." J Biol Chem **278**(47): 46911-46918.
- Woolery, K. T. and P. A. Kruk (2011). "Ovarian Epithelial-Stromal Interactions: Role of Interleukins 1 and 6." Obstetrics and Gynecology International **2011**.
- Wrana, J. L., L. Attisano, R. Wieser, F. Ventura and J. Massague (1994). "Mechanism of activation of the TGF-beta receptor." Nature **370**(6488): 341-347.
- Xiao, X., C. Huang, C. Zhao, X. Gou, L. K. Senavirathna, M. Hinsdale, P. Lloyd and L. Liu (2015). "Regulation of myofibroblast differentiation by miR-424 during epithelial-to-mesenchymal transition." Archives of Biochemistry and Biophysics **566**: 49-57.

- Yamada, M., H. Kurihara, K. Kinoshita and T. Sakai (2005). "Temporal expression of alpha-smooth muscle actin and drebrin in septal interstitial cells during alveolar maturation." J Histochem Cytochem **53**(6): 735-744.
- Yan, X. and Y.-G. Chen (2011). "Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling." Biochemical Journal **434**(1): 1–10.
- Yang, H. M. F., J. MD; Xue,X. MM; Yao,L. MD; Qiao,L. MD; Hou,A. MD; Jin,L. MM; Xing,Y. MM (2014). "Epithelial-Mesenchymal Transitions in Bronchopulmonary Dysplasia of Newborn Rats." Pediatric Pulmonology **49**: 1112-1123.
- Yi, J. Y., I. Shin and C. L. Arteaga (2005). "Type I Transforming Growth Factor β Receptor Binds to and Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase." Journal of Biological Chemistry **280**(11): 10870-10876.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.
- Zavadil, J., J. Haley, R. Kalluri, S. K. Muthuswamy and E. Thompson (2008). "Epithelial-Mesenchymal Transition." Cancer Research **68**(23): 9574–9577.
- Zeisberg, M., J. Hanai, H. Sugimoto, T. Mammoto, D. Charytan, F. Strutz and R. Kalluri (2003). "BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury." Nat Med **9**(7): 964-968.
- Zeng, Y., R. Yi and B. R. Cullen (2005). "Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha." Embo j **24**(1): 138-148.
- Zhang, H. Y., M. Gharaee-Kermani, K. Zhang, S. Karmiol and S. H. Phan (1996). "Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." The American Journal of Pathology **148**(2): 527-537.
- Zhang, X., W. Peng, S. Zhang, C. Wang, X. He, Z. Zhang, L. Zhu, Y. Wang and Z. Feng (2011). "MicroRNA Expression Profile in Hyperoxia-Exposed Newborn Mice During the Development of Bronchopulmonary Dysplasia." Respiratory Care **56**(7): 1009–1015.
- Zhang, Y. C., C.; Gehling, D.J.; Hemmati-Brivanlou, A.; Derynck, R. (2001). "Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase." PNAS **98**(3): 974-979.
- Zhang, Y. E. (2009). "Non-Smad pathways in TGF- β signaling." Cell Research **19**: 128-139.
- Zhao, J., W. Shi, H. Chen and D. Warburton (2000). "Smad7 and Smad6 Differentially Modulate Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of Embryonic Lung Morphogenesis." Journal of Biological Chemistry **275**(31): 23992-23997.
- Zhu, H., P. Kavsak, S. Abdollah, J. L. Wrana and G. H. Thomsen (1999). "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation." Nature **400**(6745): 687-693.
- Zysman-Colman MD, Z. T. M., G.M. ;Bandeali MSc,S. ;Landry MD MSc, J.S. (2013). "Bronchopulmonary dysplasia – trends over three decades" Paediatric Child Health **18**(2): 86-90.

13 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Werner Seeger und meinem Betreuer Dr. Rory Morty bedanken. Ich hätte mich damals, ohne die kleine Infoveranstaltung und die Liste mit Ansprechpartnern im Rahmen Ihrer Vorlesung, Herr Prof. Seeger, vielleicht nie auf eine Promotion beworben. Ganz abgesehen davon, dass Sie mich insgesamt im Zuge meines Studiums an der JLU und somit am UKGM in Ihren verschiedenen Funktionen begleitet haben. Rory hat mir dann auch tatsächlich die Möglichkeit gegeben, an einem Themengebiet zu arbeiten, das mich sehr interessiert und hat mir, trotz meiner eigenen anfänglichen Unsicherheit, Vertrauen geschenkt.

Die Arbeit im Labor hat dann einfach echt Spaß gemacht, man wurde wirklich offen empfangen und war in dieser Zeit fester Bestandteil des Teams, was auch Rorys alljährliches Weihnachtsessen miteinschloss. Ob wissenschaftliche Belange, Fragen zu technischen Methoden oder den zunächst fremden Räumlichkeiten, bis heute konnte ich mich immer an euch wenden! Mittagspausen waren bei uns nie langweilig und an Tagen, an denen kein Ergebnis war wie erhofft, haben alle mal Aufmunterung gebraucht! *Με βοήθησες πολύ και ήσουν για μένα πάντα εκεί, δεν το ξεχνάω αυτό!* Ich danke euch von Herzen Elpidoforos (alias Akis), Ivana, Claudio, Jordi, Diogo, Agnieszka, David und natürlich Philipp, mein „*partner in crime*“!

Anderen Freunden gilt mein Dank für die Hilfe hier und da bei Ärger mit meinem Computer oder durch fundierteres Wissen über *Word*. Vor allem aber danke für die Rahmenbedingungen, ohne offene Ohren und einen privaten Ausgleich geht so etwas nicht.

Geschrieben habe ich die Promotion zwar alleine, aber die Höhen und Tiefen mittragen mussten - mal wieder - meine Eltern, Beate und Christian, und meine Geschwister mit ihren Familien. Ich hoffe insgesamt halten sich Berg und Tal ja doch meist wenigstens die Waage und ich gebe, innerhalb unserer mittlerweile gut besetzten drei Generationen, auch immer wieder etwas zurück. Bedingungslose Unterstützung gepaart mit ehrlicher Kritik, Trost und Ermutigung, so ist das schon mein ganzes Leben! Mama, Papa, Bastian und Rabea - Tausend Dank.